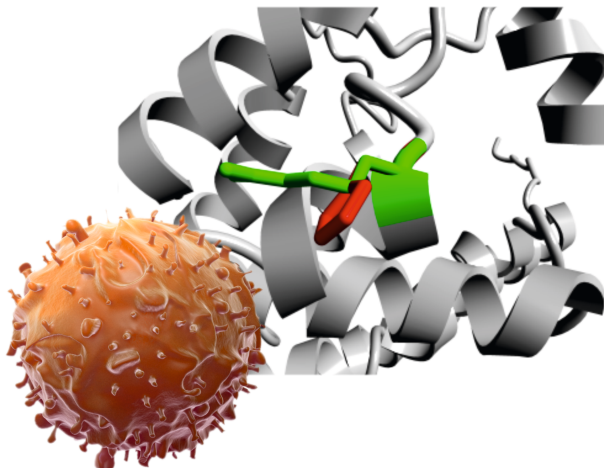


DENIS PAKSOY

Genetische Analysen des Formyl-Peptid-Rezeptors
bei Patienten mit aggressiver Parodontitis



INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Genetische Analysen des Formyl-Peptid-Rezeptors
bei Patienten mit aggressiver Parodontitis**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Denis Paksoy

aus Essen

Gießen 2017

Poliklinik für Parodontologie
Medizinisches Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
des Universitätsklinikums Giessen und Marburg GmbH
Direktor: Prof. Dr. J. Meyle

Gutachter: Prof. Dr. J. Meyle

Gutachter: Prof. Dr. D. Nolte

Tag der Disputation: 18.09.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Pathogenese der Parodontitis	1
1.2	Aggressive Parodontitis	3
1.3	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten und ihre Bedeutung für die Abwehr bakterieller Erreger im Parodont	5
1.4	Chemotaxis	9
1.4.1	Chemotaxis polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten	10
1.5	Formyl-Peptid-Rezeptor	11
1.6	Polymorphismen des Formyl-Peptid-Rezeptors 1 bei der aggressiven Par- odontitis	15
2	Ziele der Studie	19
3	Materialien und Methoden	20
3.1	Patientenkollektiv und Kontrollgruppe	20
3.1.1	Patientenaufklärung	20
3.1.2	Gruppeneinteilung	20
3.2	Klinische und röntgenologische Untersuchung	20
3.2.1	Sondierungstiefen und Sondierungsblutungen	20
3.2.2	Gingivale Rezessionen	20
3.2.3	Klinischer Attachmentlevel	21
3.2.4	Plaqueindex	21
3.2.5	Modifizierter Papillen-Blutungsindex nach Saxer und Mühlemann	21
3.2.6	Röntgenbefund	21
3.3	Ein- und Ausschlusskriterien	22
3.3.1	Einschlusskriterien	22
3.3.2	Ausschlusskriterien	22
3.4	Laboruntersuchungen	23
3.4.1	Blutentnahme	23
3.4.2	Bestimmung der Blutsenkungsgeschwindigkeit	23
3.4.3	Blutprobensicherung, Extraktion der DNA aus Blutzellen, Amplifizie- rung der DNA	23
4	Ergebnisse	27
4.1	Patientencharakteristika	27
4.1.1	Alter und Geschlecht	27
4.1.2	Anzahl der Zähne	28
4.1.3	Sondierungstiefen und klinischer Attachmentlevel	29
4.1.4	Sondierungsblutungen	31
4.1.5	Plaqueindex	32
4.1.6	Papillenblutungsindex	33
4.1.7	Blutsenkungsgeschwindigkeit	34

4.2	Ergebnisse der genetischen Untersuchungen	37
4.2.1	Allelfrequenzen der <i>FPR1</i> -SNPs	39
4.2.2	Allelassoziationen der <i>FPR1</i> -SNPs	42
4.2.3	Haplotypen-Analyse	47
5	Diskussion	49
5.1	SNP-Analyse	49
5.1.1	Synonyme SNPs	50
5.1.2	Nicht-synonyme SNPs	51
5.1.3	Haplotypen-Analyse	56
5.2	Kritische Beurteilung von Materialien und Methoden	57
5.3	Schlussfolgerung	58
6	Zusammenfassung	60
7	Summary	61
8	Anhang	73
8.1	Einverständniserklärung	73
9	Publikationsverzeichnis	76
9.1	Vortrag	76
9.2	Posterpräsentation	76
10	Erklärung zur Dissertation	77

Abkürzungsverzeichnis

A.a.	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
ABL	Alveolarknochenlevel
AnxA1	Annexin A1
AP	aggressive Parodontitis
BOP	Sondierungsblutung
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CAL	klinischer Attachmentlevel
CHO	Hamster-Ovar-Zellen
CP	chronische Parodontitis
DAG	Diacylglycerol
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FPR	Formyl-Peptid-Rezeptor
GAgP	generalisierte aggressive Parodontitis
GPCR	G-Protein-gebundene Rezeptoren
GR	gingivale Rezession
HSPs	Hitzeschockproteine
HWE	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
ICAM 1	interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
ICSH	Council for Standardization in Haematology
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
LADS	Leukozyten-Adhäsions-Defizienz-Syndrom
LAgiP	lokalisierte aggressive Parodontitis
LD	linkage disequilibrium
LJP	lokalisierte juvenile Parodontitis
LPS	Lipopolysaccharide
LTAs	Lipoteichonsäuren
LTB ₄	Leukotrien B ₄
MAPKs	mitogenaktivierte Proteinkinasen
ORF	open reading frame

P.g. *Porphyromonas gingivalis*
PCR Polymerasekettenreaktion
PGE₂ Prostaglandin E₂
PGNs Peptidoglykane
PI3K Phosphoinositid-3-Kinase
PIP₂ Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat
PIP₃ Phosphatidylinositol-1,4,5-triphosphat
PKC Proteinkinase C
PLI Plaqueindex
PMN polymorphkernige neutrophile Granulozyten
post-LJP post-juvenile Parodontitis
PPD pocket probing depth
SBI modifizierter Sulkus-Blutungs-Index
SNP single nucleotide polymorphism
SSCP Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analysen
ST Sondierungstiefe
TK Tyrosinkinase

Materialliste

Material	Beschreibung
0,9x19mm Multify®-Kanüle	Bestell-Nr.: 85.1637.035, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
3,5ml-S-Sedivette®	Bestell-Nr.: 01.1690.001, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
7,5ml-S-Monovette®	Bestell-Nr.: 01.1601.001, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
7,5ml-S-Monovette® KE	Bestell-Nr.: 01.1605.001, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Agarose-Gel	2%ig (mit 1xTAE-Puffer angesetzt)
Desiccant Packets (1gm)	Bestell-Nr.: WB100003, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Primer 1 (FMLP 2F)	5'-GGCCGTGGCTGACTTCTG-3'
Primer 2 (FMLP 2R)	5-GGGCCACCACCTGATATG-3'
FTA Purification Reagent	Bestell-Nr.: WB120204, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
FTA® Classic Cards	Bestell-Nr.: WB120205, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Harris Uni-Core 1.2 mm punch	Bestell-Nr.: WB100028, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
HotStarTaq MasterMix Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mira-2-Ton®	Bestell-Nr.: 605 659, Hager & Werken GmbH & Co. KG, Duisburg
Multi-Barrier Pouch (Large)	Bestell-Nr.: WB100037, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
PCR-Reaktionsvolumen	81,5µl Aqua bidest., 10µl 10xPuffer (enthält Tris·Cl, KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , 15 mM MgCl ₂ ; pH 8,7 (20 °C)), 4 µl MgCl ₂ -Lösung (25 mM), 0,5 µl jeden dNTPs (je 10 mM), 1 µl jeden Primers (je 0,1 mM) und 2,5 Einheiten Taq-DNA-Polymerase
QIAquick PCR Purification Kit	Bestell-Nr.: 28106, QIAGEN, Hilden, Deutschland
Senkungspipette	Bestell-Nr.: 86.1996.062, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0
TE-1-Puffer	10 mM Tris-HCL, 0,1 mM EDTA, pH 8.0
UNC-15-Parodontometer	Fa. Hu-Friedy, Leimen, Deutschland

Abbildungsverzeichnis

1	Histologisches Präparat menschlicher subgingivaler Plaque	2
2	Beziehungen mikrobieller Komplexe	2
3	Vorkommen 40 verschiedener Keimarten in subgingivaler Plaque	3
4	Parodontopathologische Ätiologie dentaler Plaque	4
5	Transmigration von PMN	6
6	Abtötung von Bakterien durch PMN	7
7	Schematische Darstellung des menschlichen FPR in der Plasmamembran	13
8	Signaltransduktion bei Formylpeptid-Rezeptoren	14
9	Schematische Darstellung des FPR1	15
10	Schematische Darstellung der Isolierung der DNA	24
11	Amplifizierter Abschnitt des FPR1	25
12	Geschlechterverteilung	27
13	Altersverteilung	28
14	Häufigkeit eines bestimmten Alters in Jahren	28
15	Anzahl der Zähne	29
16	Sondierungstiefen	30
17	Klinischer Attachmentlevel	31
18	Sondierungsblutungen	32
19	Plaqueindex	33
20	Papillenblutungsindex	34
21	Blutsenkungsgeschwindigkeit nach einer Stunde	35
22	Blutsenkungsgeschwindigkeit nach zwei Stunden	36
23	Ternärer Plot des Hardy-Weinberg-Equilibriums für biallelische SNPs	37
24	Histogramm der Häufigkeitsverteilung der Allele des SNPs c.576T>C>G . . .	38
25	Allelfrequenzen synonyme SNPs	40
26	Allelfrequenzen nicht-synonymer SNPs	43
27	Allelassoziationen nicht-synonymer SNPs	46
28	SNP c.301G>C/p.V101L	52
29	SNP c.488G>A/p.R163H	53
30	SNP c.488G>A/p.R163H	54
31	SNP c.568A>T/p.R190W	55
32	SNP c.576T>C>G/p.N192K	56

Tabellenverzeichnis

1	Enzyme und Hauptbestandteile der Granula in PMN	8
2	Agonisten des FPR1 und ihre Funktion	12
3	Antagonisten des FPR1 und ihre Funktion	12
4	Altersverteilung	27
5	Anzahl der Zähne	29
6	Sondierungstiefen	30
7	Klinischer Attachmentlevel	31
8	Sondierungsblutungen	32
9	Plaqueindex	33
10	Papillenblutungsindex	34
11	Blutsenkungsgeschwindigkeit nach einer Stunde	35
12	Blutsenkungsgeschwindigkeit nach zwei Stunden	36
13	Tests auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium in der Kontrollgruppe	39
14	Tests auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium in der Patienten- gruppe	39
15	FPR1_c.306	40
16	FPR1_c.348	41
17	FPR1_c.546	41
18	FPR1_c.301	42
19	FPR1_c.488	42
20	FPR1_c.524	42
21	FPR1_c.568	42
22	<i>FPR1_c.576</i>	42
23	c.306T>C	44
24	c.348C>T	44
25	c.546C>A	44
26	c.301.G>C	45
27	c.488G>A	45
28	c.524C>T	45
29	c.568A>T	45
30	c.576T>C>G	47
31	c.576T>C>G	47
32	c.301/c.568	47
33	c.301/c.576	48
34	c.568/c.576	48
35	c.301/c.568/c.576	48

1 Einleitung

1.1 Pathogenese der Parodontitis

Parodontitis ist die Bezeichnung für eine entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates, bei der es zur Bildung parodontaler Taschen, Attachmentverlust, Zerstörung des parodontalen Stützgewebes und zum Abbau des Alveolarknochens kommt (LISTGARTEN, 1986). Eine Parodontitis entwickelt sich aus einer Gingivitis und kann bis zur vollständigen Lockerung und dem Verlust von Zähnen fortschreiten (KINANE, 2001).

Die primäre Ursache für die Entstehung entzündlicher Parodontalerkrankungen, liegt in der Bildung mikrobieller Plaque im Sulkus (KINANE und ATTSTROM, 2005; MADIANOS *et al.*, 2005; SHAPIRA *et al.*, 2005). Dentale Plaque ist ein Zusammenschluss verschiedener Mikroorganismen, die in einer extrazellulären Matrix aus Makromolekülen eingebettet sind und sich als Biofilm an die Zahnoberfläche anheften (MARSH, 2004). Dabei ermöglichen Spalträume und ein Kanalsystem im Biofilm den Transport von Nährstoffen und die Kommunikation über Stoffwechselprodukte (SHAPIRO, 1998; WOOD *et al.*, 2000).

In der Mundhöhle gibt es hunderte Spezies von Mikroorganismen (KOLENBRANDER, 2000; MADIANOS *et al.*, 2005). Damit es zur Bildung eines Biofilms kommen kann, werden Bakterien benötigt, welche die Fähigkeit besitzen sich an das Pellikel, das den in der Mundhöhle befindlichen Teil des Zahnes umgibt, zu binden und anderen Spezies die Möglichkeit zur Anlagerung bieten. Die Mikroorganismen im Biofilm geben Metabolite an ihr Umfeld ab, welche die Lebensbedingungen für andere Mikroorganismen verbessern oder ihnen als Nahrung dienen (SOCRANSKY und HAFFAJEE, 2005). Das Leben in der mikrobiellen Gemeinschaft bietet allen Mitgliedern Vorteile. Diese bestehen z.B. darin, dass den Mikroorganismen ökologische Nischen eröffnet werden, die ihnen isoliert verschlossen blieben, oder im erhöhten Schutz gegen schädliche Substanzen und die Immunabwehr des Wirtsorganismus (SHAPIRO, 1998; COSTERTON *et al.*, 1981; DARVEAU *et al.*, 1997).

Die Spezialisierung der Mikroorganismen führt dazu, dass die verschiedenen Spezies in einer bestimmten Konstellation in der Plaque vorliegen (Abb. 1 und Abb. 2).

Nicht alle Bakterien, die in der Plaque vorkommen, haben eine pathogene Wirkung auf das Parodont. 1996 kam eine Arbeitsgruppe auf dem „World Workshop on Clinical Periodontitis“ zu dem Schluss, dass Parodontitis hauptsächlich durch die drei pathogenen Keime *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* und *Actinobacillus actinomycescomitans* verursacht wird (OFFENBACHER und ZAMBON, 1996). Mikroorganismen, die Parodontalerkrankungen verursachen, rekrutieren sich größtenteils aus gramnegativen anaeroben Keimen, mit einigen anaeroben Cocci und einer großen Anzahl anaerober Spirochäten. Beim Fortschreiten der parodontalen Läsion vertieft sich die Tasche und der Anteil der anaeroben Keime nimmt zu (KINANE, 2001).

In einer Studie an 588 Patienten mit chronischer Parodontitis wurde die Anzahl an 40 verschiedenen subgingivalen Spezies in unterschiedlichen Taschentiefen bestimmt. Nur für die Anzahl der Keime des roten und orangen Komplexes konnte eine signifikante Relation zur Taschentiefe festgestellt werden (Abb. 3) (SOCRANSKY und HAFFAJEE, 2005).

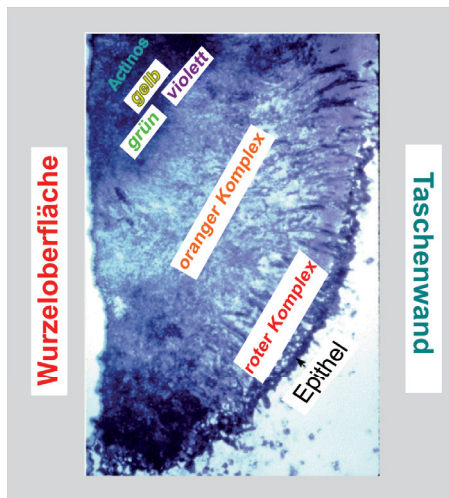


Abb. 1: Histologisches Präparat menschlicher subgingivaler Plaque mit Toluidinblau-Methylenblau-Anfärbung. Die Lokalisation verschiedener Spezies wurde dargestellt (modifiziert nach SOCRANSKY et al. 2005).

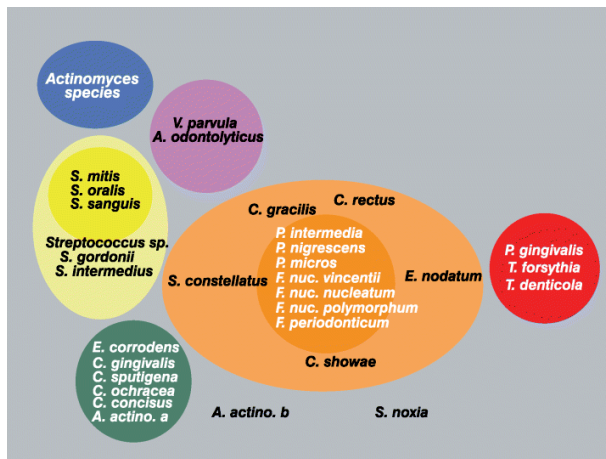


Abb. 2: Schematische Darstellung der Beziehungen innerhalb des mikrobiellen Komplexes und zwischen mikrobiellen Komplexen (SOCRANSKY et al. 2005).

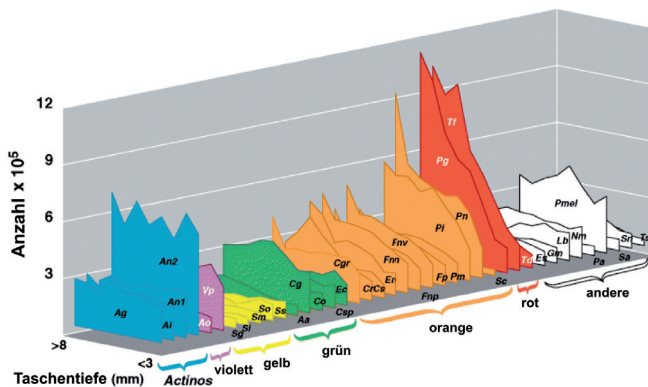


Abb. 3: Vorkommen 40 verschiedener Keimarten in subgingivaler Plaque aus Zahnfleischtaschen mit unterschiedlicher Tiefe, die von Patienten mit Parodontitis stammen (modifiziert nach SOCRANSKY et al. 2005).

Die akkumulierte Plaque enthält Stoffwechselprodukte, aber auch Fragmente von Mikroorganismen (NISHIHARA und KOSEKI, 2004). Zu diesen Substanzen gehören z.B. Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykane (PGNs), Lipoteichonsäuren (LTAs), Hitzeschockproteine (HSPs), Toxine, Proteasen und Fibrinolyse (MADIANOS *et al.*, 2005; SCHENKEIN, 1999). Diese Stoffe können sowohl eine direkte als auch eine indirekte, über die Immunantwort eingeleitete Gewebsschädigung hervorrufen, welche sich in der Zerstörung von Knochen und Stützgewebe zeigt (MADIANOS *et al.*, 2005; NISHIHARA und KOSEKI, 2004; SCHENKEIN, 1999).

Der Verlauf parodontaler Erkrankungen ist interindividuell verschieden und von einer großen Anzahl von Faktoren abhängig. Gingivitisläsionen müssen nicht zwangsläufig bis zur Manifestation einer Parodontitis fortschreiten (LISTGARTEN, 1986; KINANE und ATTSTROM, 2005). Zahlreiche Risikofaktoren, welche die Entstehung und den Verlauf einer Parodontitis beeinflussen, werden diskutiert. Als sichere Risikofaktoren gelten Rauchen, das Vorhandensein bestimmter Keime in der Mundflora, ungenügend therapierter Diabetes mellitus und verschiedene Syndromerkrankungen (z.B. Chédiak-Higashi-Syndrom, Down-Syndrom, Papillon-Lefèvre-Syndrom). Die Bedeutsamkeit anderer Einflussgrößen wie Alter, Geschlecht, ethnische Herkunft, sozioökonomischer Status, Ernährung, genetische Prädisposition und psychoemotionaler Stress muss noch weiter untersucht werden (KINANE, 2001; BORRELL und PAPAPANOU, 2005; BURT, 2005; HEITZ-MAYFIELD, 2005; NISHIDA *et al.*, 2000).

1.2 Aggressive Parodontitis

Die aggressive Parodontitis (AP) ist eine spezifische Krankheitsform, die durch eine rasch fortschreitende Destruktion des parodontalen Stützgewebes und Lockerung der betroffenen Zähne charakterisiert ist. Die Patienten sind abgesehen von der Parodontitis klinisch gesund und weisen eine auffällige familiäre Häufung des Krankheitsbildes auf (LANG,

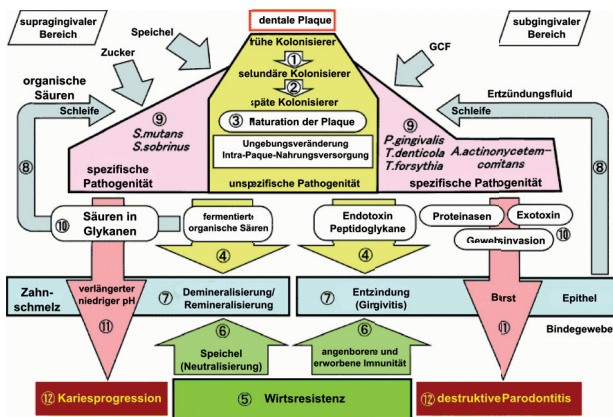


Abb. 4: **Aktuelles Modell der parodontopathologischen Ätiologie dentaler Plaque.** Die Darstellung zeigt, dass dentale Plaque sowohl der Ausgangspunkt für die Entstehung von Erkrankungen der Zahnhartsubstanz (linker Schenkel) als auch für die Entstehung von Erkrankungen des Zahnhalteapparates (rechter Schenkel) ist. Die Wirtsresistenz nimmt im supragingivalen wie im subgingivalen Milieu Einfluss auf Kariesprogression und destruktive Parodontitis. (modifiziert nach NISHIHARA et al. 2004)

1999). Generell manifestiert sich die Krankheit durch weitere Begleitscheinungen, die aber nicht obligatorisch sind: Die Menge der vorhandenen Plaque steht häufig nicht im Verhältnis zum Schweregrad der Zerstörung des parodontalen Gewebes (LANG, 1999). Die Progression der Gewebsdestruktion kann selbstlimitierend sein. Populationen von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.) und *Porphyromonas gingivalis* (P.g.) sind vermehrt zu finden (ASIKAINEN, 1986; LOPEZ et al., 1995; TEW et al., 1985; VAN WINKELHOFF et al., 1989). Die Phagozytenfunktion ist zum Teil abnormal (GENCO et al., 1986, 1980; VAN DYKE et al., 1980). Ein hyperresponsiver Makrophagen-Phänotyp mit erhöhter Produktion von PGE_2 und $IL-1\beta$ wird vermutet (MASADA et al., 1990; OFFENBACHER und ZAMBON, 1996).

Nach der Einteilung des „International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions“ unterscheidet man seit 1999 eine lokale von einer generalisierten Form der aggressiven Parodontitis (LANG, 1999).

Bei der lokalisierten aggressiven Parodontitis setzt die Krankheit für gewöhnlich während der Pubertät mit der parodontalen Zerstörung an den ersten Molaren und den mittleren Schneidezähnen ein. Oft können Serumantikörper als Antwort auf die Infektionserreger nachgewiesen werden. Bei der generalisierten aggressiven Parodontitis sind die betroffenen Patienten meist jünger als 30 Jahre. Der generalisierte Attachmentverlust tangiert mindestens drei bleibende Zähne außer den ersten Molaren und den Inzisiven. Die Krankheit nimmt einen schubhaften Verlauf mit Phasen bezeichnender Zerstörung.

1.3 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten und ihre Bedeutung für die Abwehr bakterieller Erreger im Parodont

Viele Abwehrmechanismen des Wirts gegen die Angriffe bakterieller Erreger im Parodont sind bekannt (PAGE und SCHROEDER, 1981). Dennoch gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass phagozytische Zellen wie Monozyten oder dendritische Zellen, besonders aber polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) eine Schlüsselrolle bei der Abwehr bakterieller Erreger im Parodont besitzen (GENCO *et al.*, 1986; GUARNIERI *et al.*, 1989; PAGE *et al.*, 1985).

PMN sind Zellen der angeborenen Immunantwort. Sie stammen aus der myeloischen Zelllinie und entstehen im Knochenmark. Auch wenn ihre Halbwertszeit im Blut nur sechs bis neun Stunden beträgt, sind sie die häufigsten zirkulierenden weißen Blutzellen und die prädominanten Abwehrzellen in den parodontalen Taschen (DELIMA und VAN DYKE, 2003; KANTARCI *et al.*, 2006). Bei gesunden Individuen befinden sich die PMN in den oberflächlichen Schichten des Sulkusepithels und am Grund der Zahnfleischfurche (DELIMA und VAN DYKE, 2003). Mikroorganismen und aktivierte Zellen des Saumepithels setzen proinflammatorische Mediatoren frei, die über das Saumepithel ins Bindegewebe gelangen. Im Falle der Mikroorganismen sind das beispielsweise LPS, die Endothelzellen entweder direkt oder indirekt über die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren aus Bindegewebszellen, durch Aktivierung des Komplementsystems oder die Induktion der Kininproduktion stimulieren (KORNMAN *et al.*, 1997). Die Stimulation des Endothels zeigt sich in einer gesteigerten vaskulären Permeabilität, der Expression von E-Selektin und in der Abgabe von spezifischen Leukozyten aktivierenden Agentien. Über Sialyl-Lewis-X gehen zirkulierende PMN eine lose Bindung mit dem E-Selektin des Endothels ein. Dies führt dazu, dass die Phagozyten abgebremst werden und an der Gefäßwand entlang rollen. So beginnt der Vorgang der Leukozytendiapedese in das entzündliche Gewebe, der sich mit der Interaktion von Leukozytenadhäsionsrezeptoren (CD11/18) mit dem interzellulären Adhäsionsmolekül 1 (ICAM 1) des Endothels bis zur Extravasation ins Bindegewebe fortsetzt (KORNMAN *et al.*, 1997; VAN DYKE und HOOP, 1990). Im Gewebe bewegen sich die PMN mit Hilfe des ICAM-Rezeptors entlang eines Konzentrationsgradienten unter anderem von Interleukin-8 (IL-8), der als Antwort auf die bakterielle Stimulation von Epithelzellen, Fibroblasten oder Makrophagen unterhalten wird (DIXON *et al.*, 2004). Nach diesem Prinzip werden die PMN in die Richtung der Infektionsursache dirigiert (DEL *et al.*, 2000). Über das Saumepithel gelangen die PMN schließlich in den Parodontalspalt, wo sie einen „Verteidigungswall“ bilden, der sich zwischen dem Biofilm und dem zu schützenden Gewebe erstreckt (Abbildung 5) (DELIMA und VAN DYKE, 2003; DIXON *et al.*, 2004; SCHENKEIN, 2006). Die PMN sind die erste Verteidigungslinie der angeborenen Immunantwort gegen bakterielle Infektionen (KANTARCI *et al.*, 2003; VAN DYKE und SERHAN, 2003).

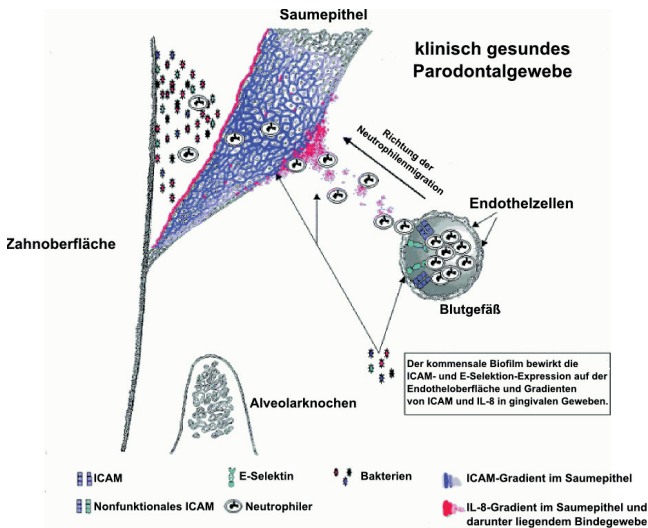


Abb. 5: **Transmigration von PMN im Parodontalgewebe bei bakterieller Stimulation**
(modifiziert nach DIXON et al. 2004)

Um der bakteriellen Invasion entgegenzuwirken stehen den PMN eine Reihe weiterer Funktionen zur Verfügung. Neben den genannten endogenen Chemokinen wird die chemotaktische Aktivität der PMN auch durch exogene Lockstoffe wie bakterielle Stoffwechselprodukte bestimmt, die es ihnen ermöglichen die Mikroorganismen im parodontalen Spalt ausfindig zu machen (DENNISON und VAN DYKE, 1997). Um die Fremdzellen zu erkennen verfügen die PMN über verschiedene Rezeptoren (z.B. Komplementrezeptoren (CR1, CR3, CR3b, CR4), Fc-Rezeptoren), die mit Komplementfaktoren (C3b, C4b, C5a) und Immunglobulinen (IgG, IgE, IgA) interagieren und außerdem zur Phagozytose der Mikroorganismen und ihrer Stoffwechselprodukte beitragen (VAN DYKE und HOOP, 1990; DENNISON und VAN DYKE, 1997).

Die Abtötung von Keimen erfolgt entweder intrazellulär oder extrazellulär (Abbildung 6). Die intrazelluläre Abtötung beginnt mit der Anlagerung eines PMN an ein opsonisiertes Bakterium. Durch Invagination der Plasmamembran wird die Fremdzelle in ein Phagosom eingeschlossen. Zytoplasmatische Granula fusionieren mit dem Phagosom und liefern lytische Enzyme und oxidative Substanzen, die in dem so entstandenen Phagolysosom für die Zerstörung und die Verstoffwechselung des Bakteriums sorgen (DELIMA und VAN DYKE, 2003; VAN DYKE und HOOP, 1990; DENNISON und VAN DYKE, 1997). Der extrazelluläre Abtötungsmechanismus ist sowohl wirkungsvoller als auch folgenreicher. Hierbei fusionieren die Granula mit der Zellmembran des PMN und geben ihren Inhalt an das extrazelluläre Milieu ab. Diese Degranulation kann durch Stimulation mit bakteriellen Chemokinen provoziert werden (DELIMA und VAN DYKE, 2003; VAN DYKE und HOOP, 1990; BIASI *et al.*, 1999).

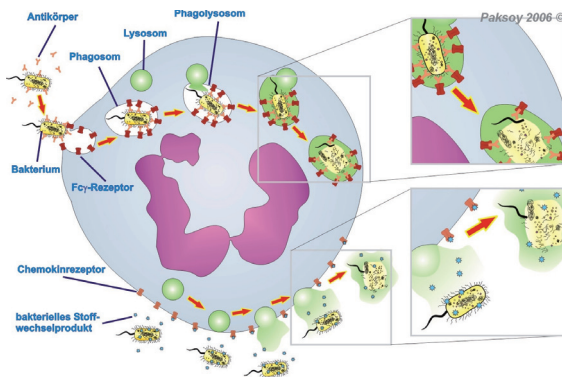


Abb. 6: **Abtötung von Bakterien durch PMN.** Im oberen Teil der Abbildung wird der extrazelluläre, im unteren Teil der intrazelluläre Abtötungsmechanismus schematisiert. Das Ziel ist jeweils die Zerstörung der Fremdzelle (PAKSOY 2006).

Trotz der Bedeutung der antimikrobiellen Aktivität der PMN müssen die Konsequenzen der extrazellulären Abtötung beachtet werden. Einige Autoren verwenden in diesem Zusammenhang den Begriff eines „zweischneidigen Schwertes“ (DELIMA und VAN DYKE, 2003; LIU *et al.*, 2001; SMITH, 1994). Für die Elimination von Bakterien sind zwei verschiedene Arten von Granula in den PMN vorhanden; sie werden als primäre (azurophile) und sekundäre (spezifische) Granula bezeichnet. Die Granula enthalten unter anderem mikrobizide Enzyme, neutrale Proteinasen und saure Hydrolasen (siehe Tabelle 1). Diese Substanzen sind in der Lage nahezu alle biologisch relevanten Stoffgruppen wie Lipide, Kohlenhydrate, Eiweiße oder Nukleinsäuren zu zerstören. Die destruktive Wirkung betrifft nicht nur Fremdzellen, sondern natürlich auch die Gewebe des Wirts. Wenn der Inhalt der Granula durch Exozytose in den Extrazellularraum gelangt, besitzen selbst die PMN keine Schutzmechanismen, welche die Lyse ihrer Plasmamembran und ihr Absterben verhindern können. Die Unterbrechung der Zellmembrankontinuität resultiert in einer weiteren Freisetzung schädlicher Substanzen, so dass sich der Effekt potenziert (DELIMA und VAN DYKE, 2003; KANTARCI *et al.*, 2003; DENNISON und VAN DYKE, 1997; WITKO-SARSAT *et al.*, 2000). Hinzu kommt, dass die aktivierten PMN weitere chemotaktische Botenstoffe sezernieren, die zu einer gesteigerten Infiltration von Entzündungszellen in das Infektionsgebiet führen (DELIMA und VAN DYKE, 2003; VAN DYKE und SERHAN, 2003).

Leukotrien B₄ (LTB₄) und Prostaglandin E₂ (PGE₂) gehören hierbei zu den potentesten Stimuli, die von PMN ausgeschüttet werden. Beide werden mit pathophysiologischen Ereignissen in Verbindung gebracht (KANTARCI *et al.*, 2006; VAN DYKE und SERHAN, 2003). Eine übermäßige Akkumulation von aktivierten PMN besitzt also das Potential parodontales Gewebe massiv zu beschädigen. Den genannten „pro-inflammatorischen Mediatoren“ stehen „anti-inflammatorische Mediatoren“ wie die Lipoxine, Resolvine und Docosatriene gegenüber. Lipoxinen wird beispielsweise eine protektive Rolle zugesprochen, da sie eine hemmende Wirkung auf den Einstrom von PMN besitzen (KANTARCI *et al.*, 2006; KANTARCI und VAN DYKE, 2005b,a). Die dargestellten Vorgänge beschreiben

Tabelle 1: **Enzyme und Hauptbestandteile der Granula in PMN** (DENNISON et al. 1997)

Stoffgruppe	primäre Granula	sekundäre Granula
mikrobizide Enzyme	Myeloperoxidase Lysozym	Lysozym
neutrale Proteinasen	Elastase Cathepsin G Proteinase 3	Kollagenase
saure Hydrolasen	N-Acetyl- β -glucosaminidase Cathepsin B Cathepsin D β -Glucuronidase β -Glycerophosphatase β -Mannosidase	
andere	Defensine kationische Proteine bakterizider oder permeabilitätssteigernder Faktor	Lactoferrin iC3b-Rezeptor (CR3) Vitamin B ₁₂ -bindendes Protein (Kobalophilin) Cytochrom b ₂₄₅

ein komplexes System, in dem sich actio und reactio im Gleichgewicht befinden müssen, damit es nicht zu einer überschüssenden Entzündungsreaktion kommt, die dem Wirtsorganismus größeren Schaden zufügt als der Entzündungsauslöser selbst. Das Gegenbeispiel zu dieser hyperresponsiven ist eine hyporesponsive Immunreaktion, bei der die Intensität der Abwehrmechanismen nicht ausreicht, um die bakteriellen Erreger wirkungsvoll zu bekämpfen, so dass es auch in diesem Fall zu erheblichen Gewebeschäden kommt (PRESHAW *et al.*, 2004). Diverse Krankheitsbilder gelten als Manifestation gestörter PMN-Funktionen. Beim Chédiak-Higashi-Syndrom ist die Degranulation abnormal, bei der septischen Granulomatose ist die intrazelluläre Abtötung vermindert und beim Leukozyten-Adhäsions-Defizienz-Syndrom (LADS) ist die Expression von Adhäsionsmolekülen reduziert. Dies sind nur drei Beispiele für Syndromerkrankungen, die auf Zellfunktionsstörungen von PMN beruhen und sich unter anderem in einer immensen Beeinträchtigung der oralen Gesundheit zeigen. Patienten, die an diesen Erkrankungen leiden, weisen Abszesse, orale Ulzera sowie schwere Fälle von Parodontitis und Gingivitis auf (GENCO *et al.*, 1986; KANTARCI *et al.*, 2003; PRESHAW *et al.*, 2004). Auch bei der Pathogenese der lokalisierten aggressiven Parodontitis scheinen PMN von entscheidender Bedeutung zu sein. In der Vergangenheit ist eine Hypofunktionalität der PMN bei Patienten mit lokalisierter aggressiver Parodontitis vermutet worden (KANTARCI *et al.*, 2003). Neuere Erkenntnisse geben Hinweise darauf, dass eine Hyperfunktionalität der PMN bei dieser Erkrankungsform nicht ausgeschlossen werden kann (KANTARCI *et al.*, 2003). BIASI et al. (BIASI *et al.*, 1999) haben die Superoxidanionenproduktion in PMN bei Gesunden und Patienten mit aggressiver Parodontitis nach der Stimulation mit Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), Phorbol-Myristat-Acetat und Zymosan verglichen. Die Superoxidanionenproduktion bei Stimulation der PMN mit fMLP war bei Patienten mit aggressiver Parodontitis reduziert, während es bei der Stimulation mit den anderen Agentien keine Unterschiede zwischen den Erkrankten und der Kontrollgruppe gab. SIGUSH

et al. (SIGUSCH *et al.*, 2001) haben Patienten mit lokalisierter aggressiver Parodontitis (LAGP), Patienten mit generalisierter aggressiver Parodontitis (GAGP) und Patienten mit chronischer Parodontitis (CP) auf eine veränderte fMLP-induzierte Chemotaxis der PMN untersucht. Im Vergleich zu einer Kontrollgruppe war die chemotaktische Aktivität bei Patienten mit chronischer Parodontitis erhöht, während die Chemotaxis bei Patienten mit aggressiver Parodontitis reduziert war. GRONERT *et al.* (GRONERT *et al.*, 2004) haben bei der Stimulation mit LTB₄ von PMN bei Patienten mit lokalisierter aggressiver Parodontitis eine Abnahme der transendothelialen Migration um 82% und gleichzeitig jedoch eine Zunahme der Superoxidanionen-Generierung um 487% im Vergleich zu asymptomatischen Patienten beobachten können. Es könnten noch viele andere Ergebnisse herangezogen werden, die zu unterschiedlichen Thesen geführt haben. Letztlich zeigt sich, dass essentielle Fragen zur Rolle der PMN bei der Pathogenese der Parodontitis weiter analysiert werden müssen.

1.4 Chemotaxis

Ganz allgemein wird die Veränderung der Geschwindigkeit oder der Frequenz der Zelllokomotion durch chemische Substanzen als Chemokinese bezeichnet (WILKINSON, 1998). Chemotaxis hingegen beschreibt die gerichtete Migration entlang eines Konzentrationsgradienten einer umgebenden Substanz, wie sie bei verschiedenen prokaryotischen und eukaryotischen Zellen zu sehen ist (LEHRER, 1971; SCHIFFMANN *et al.*, 1975a). Bewegen sich die Zellen von einer höheren Konzentration in Bereiche niedrigerer Konzentrationen von Chemokinen, liegt eine negative Chemotaxis vor. Im umgekehrten Fall spricht man von positiver Chemotaxis (LAUFFENBURGER *et al.*, 1982). Am Beispiel von neutrophilen Granulozyten zeigt sich, dass einige Zellen in Abwesenheit von Chemokinen in Ruhe verbleiben, während sich andere ohne definierbares Ziel bewegen. Diese ungerichtete Bewegung nennt man zufällige Migration (MALECH *et al.*, 1977). Werden neutrophile Granulozyten einem Chemokin in uniformer Konzentration ausgesetzt, erhöht sich die zufällige Migration. Man spricht dann von aktivierter zufälliger Migration (MALECH *et al.*, 1977).

Bereits im Jahre 1676 beobachtete der niederländische Naturforscher Antoni van Leeuwenhoek die Bewegung von Bakterien in Pfeffer-Wasser (BECKER, 1990). Die Chemotaxis von Leukozyten in ein Entzündungsgebiet wurde zuerst 1888 von dem deutschen Ophthalmologen Theodor Carl Gustav von Leber beschrieben (SCHRÖDER, 2000; WILKINSON, 1998; MEYLE, 1996). Massart und Bordet berichteten 1891, dass Chemotaxis durch Substanzen, die im entzündeten Gewebe gebildet werden, ausgelöst wird (KELLER und SORKIN, 1965).

Chemotaxis ermöglicht Mikroorganismen Nährstoffe aufzufinden oder aber noxischen Stimuli zu entgehen (ZIGMOND, 1978; VAN HAASTERT und DEVREOTES, 2004). Chemotaxis ist bei der Wundheilung dafür verantwortlich, dass dermale Fibroblasten in das Blutkoagel einwandern und Epithelzellen auf die Wundfläche migrieren, um diese abzudecken (SCHNEIDER und HAUGH, 2006; GILLITZER und GOEBELER, 2001). Für Leukozyten stellt Chemotaxis eine zentrale Rolle bei der Akkumulation im infizierten Gewebe dar. Dabei ist

zu bedenken, dass das Auffinden schädlicher Bakterien die Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Abwehr derselbigen durch Abwehrzellen ist (EDDY *et al.*, 2000; SERVANT *et al.*, 1999; ZIGMOND, 1978). Diese Beispiele zeigen, dass sehr unterschiedliche Zelltypen über chemotaktische Fähigkeiten verfügen. Es ist einleuchtend, dass nicht jede chemische Substanz einen chemotaktischen Stimulus für jegliche Zellart darstellen kann. Andererseits kann ein und dasselbe Chemokin auf die eine Zellart positiv und auf die andere Zellart negativ chemotaktisch wirken. So zieht z.B. Sauerstoff aerobe Keime an, während anaerobe Keime den für sie schädlichen Sauerstoff meiden (LAUFFENBURGER *et al.*, 1982). Darüber hinaus ist auch die Konzentration des Chemokins für die Zellreaktion entscheidend. Bei Leukozyten werden beispielsweise bei niedrigen Konzentrationen entsprechender Substanzen motilitätsbetreffende Funktionen wie Verformung oder zytoskelettale Umstrukturierung ausgelöst, während sehr viel höhere Konzentrationen derselben Substanzen mikrobizide und zytotoxische Zellfunktionen initiieren können (VAN DYKE und HOOP, 1990). Prinzipiell kann man festhalten, dass spezifisch wirkende Chemokine existieren, die in Interaktion mit bestimmten Rezeptoren auf der Zelloberfläche treten müssen und so eine spezifische Reaktion in der Zelle auslösen, die zu einer gerichteten Bewegung der Zelle führt.

1.4.1 Chemotaxis polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten

Stellt man sich einen lokalen Infiltrationsherd mit bakteriellen Erregern vor, die eine zentrale Position bezogen haben, so ist es klar, dass die Konzentrationen bakterieller Metabolite und die azellulärer Bestandteile des Immunsystems wie z.B. aktiviertes Komplement oder Zytokine vom Zentrum zur Peripherie hin abnehmen. Abwehrzellen registrieren nicht nur das Vorhandensein entzündungsspezifischer Substanzen, sondern sie besitzen darüber hinaus die Fähigkeit Konzentrationsunterschiede dieser Substanzen in ihrer Umgebung festzustellen. Ein Beispiel für solche Abwehrzellen sind PMN. WARD *et al.* (WARD *et al.*, 1965) entdeckten, dass Komplement bei PMN Chemotaxis induziert. Ursprünglich herrschte die Annahme, dass sowohl C5a als auch C3a Chemotaxis bei PMN auslösen (DAMERAU *et al.*, 1978), später jedoch stellte sich heraus, dass nur C5a ein potentes Chemokin für PMN darstellt (FERNANDEZ *et al.*, 1978). Die entsprechende Schnittstelle auf den PMN ist der C5a-Rezeptor (BENDER *et al.*, 1987). Andere bekannte Stimuli für diese Zellart sind beispielsweise N-formylierte Peptide, welche bei der bakteriellen Proteinbiosynthese entstehen oder auch mitochondrialen Ursprungs sein können (SELVATICI *et al.*, 2006), sowie LTB₄ und IL-8 (GOETZL und PICKETT, 1981; SAMANTA *et al.*, 1990).

PMN registrieren schon geringste Konzentrationsunterschiede in ihrer Umgebung. Im isomolaren Medium beträgt der Durchmesser von sphärischen PMN ca. 7 µm (SCHMID-SCHÖNBEIN *et al.*, 1980). Ein polarisierter PMN hat eine Zelllänge von ca. 10 µm. Über die Zelllänge - d.h. also über eine Distanz von 7-10 µm – können PMN Konzentrationsunterschiede ab 1% wahrnehmen (ZIGMOND, 1977).

1.5 Formyl-Peptid-Rezeptor

SCHIFFMANN *et al.* (SCHIFFMANN *et al.*, 1975b) gelang es, chemotaktisch aktive Fraktionen von *Escherichia coli*-Kulturen zu gewinnen. Es stellte sich dabei heraus, dass es sich um 150 bis 1500 Daltons schwere, bei neutralem pH-Wert anionische, hitze-stabile Proteine handelte. In weiteren Untersuchung konnte gezeigt werden, dass diese Proteine N-Formyl-Methionyl-Peptide waren (SCHIFFMANN *et al.*, 1975a).

Für die Erkennung von N-Formyl-Peptiden stehen den PMN zwei Rezeptoren zur Verfügung. Diese sind der hochaffine Formyl-Peptid-Rezeptor (FPR1), der schon bei geringen Ligandenkonzentrationen Chemotaxis induziert, und der niedrigaffine FPR2/ALX (früher formyl peptide receptor-like 1), der bei hohen Ligandenkonzentration zytotoxische Mechanismen der PMN aktiviert (SELVATICI *et al.*, 2006). Beide Rezeptoren und ebenso die Rezeptoren für die Chemokine C5a, LTB₄ und IL-8 gehören der Gruppe der G-Protein-gebundenen Rezeptoren (GPCR) an (HEIT *et al.*, 2002). Etwa 900 Zelloberflächenrezeptoren zählen zu den GPCRs, so dass diese die größte Familie dieser Rezeptoren darstellen (JALINK und MOOLENAAR, 2010). Der FPR1 war der erste GPCR auf PMN der geklont und anschließend sequenziert werden konnte (BOULAY *et al.*, 1990a).

Durch funktionelle Charakterisierung wurde der FPR1 zuerst auf humanen und Kaninchen-PMN entdeckt (YE *et al.*, 2009). Anfangs wurde vermutet, dass das Vorkommen des Rezeptors nur auf PMN und Monozyten beschränkt sei. Mit dem Fortschritt analytischer Techniken gelang später jedoch der Nachweis auf nicht-myeloiden Zellen, wie Hepatozyten, dendritischen Zellen und Astrozyten (PROSSNITZ und YE, 1997). Mittlerweile ist bekannt, dass der FPR1 in verschiedensten Körperzellen und Organen exprimiert wird. Dazu gehören unter anderem Zellen des Knochenmarks, Endothelzellen, Fibroblasten, die Niere, die Lunge, die Milz und das Herz (GAVINS, 2010).

Ebenso hat sich im Laufe der Zeit die Liste der möglichen Liganden erweitert. Mit Ausnahme des Eicosanoids LXA4 sind alle bekannten Liganden der FPR-Familie Peptide (YE *et al.*, 2009). Neben den exogenen N-Formyl-Peptiden kommen auch endogene Liganden in Frage. Das endogene Annexin A1 (AnxA1), das ein glukokortikoid-reguliertes Protein ist und der Extravasation von Leukozyten entgegenwirkt, wurde umfangreich untersucht (GAVINS, 2010). Es ist in der Lage bei Monozyten chemotaktische Reaktionen zu aktivieren und desensitiert die Zellen bei bestimmten Stimulationen mit bakteriellen Peptid-Agonisten (ERNST *et al.*, 2004). Auch andere endogene Liganden wie das Akute-Phase-Protein Serum-Amyloid A und PrP106-126, das bei Prionenerkrankungen gefunden wurde, sind von physiologischer Relevanz (GAVINS, 2010). Darüber hinaus wurden synthetische Peptide aus Peptid-Bibliotheken als mögliche FPR-Liganden identifiziert (FU *et al.*, 2006). Die synthetischen Hexapeptide WKYMVM und WKYVM sind sogenannte "W-Peptide", welche die Phosphoinositidhydrolyse bei PMN stimulieren können (MIGEOTTE *et al.*, 2006). In den Tabellen 2 und 3 sind einige bekannte Agonisten und Antagonisten des FPR1 aufgelistet.

Tabelle 2: **Agonisten des FPR1 und ihre Funktion** (GAVINS, 2010; MIGEOTTE *et al.*, 2006; YE *et al.*, 2009)

Agonist	Ursprung/Beschreibung	KD/EC ₅₀ /IC ₅₀	Effekt
fMLF und Analoge	Gramnegative Bakterien	0,1-1 nM	Chemotaxis, Lysozymausschüttung, Sauerstoffanionenproduktion
HIV1 T20 (DP178)	HIV-ILAVgp41 (aa 643-678)	0,5 µM	Chemokin und Aktivator für periphere Leukozyten
HIV1 T21 (DP107)	HIV-ILAVgp41 (aa558-595)	0,1 µM	Chemokin und Aktivator für periphere Leukozyten
Cathepsin G	PMN	85 nM	Chemokin für phagozytische Leukozyten
LL-37	hCAP18 (aa1-37)	1 µM	Chemokin für periphere PMN, Monozyten und T-Zellen
WKYMVM	Random peptide library	30 nM	PMN-Aktivierung
MKYMVM-Peptid	Random peptide library	1 nM	PMN-Aktivierung
Formylpeptide	Mitochondriale Proteine	nM	Chemokin und Aktivator für periphere Leukozyten
Ac2-12	Annexin 1 (aa 1-12)	µM	Kardioprotektive Wirkung im Mausmodell

Tabelle 3: **Antagonisten des FPR1 und ihre Funktion** (GAVINS, 2010; MIGEOTTE *et al.*, 2006; YE *et al.*, 2009)

Antagonist	Ursprung/Beschreibung	Effekt
CDCA	Chenodesoxycholsäure, primäre Gallensäure	inhibiert Chemotaxis und Migration
CHIPS	<i>S. aureus</i>	inhibiert Chemotaxis bei <i>S. aureus</i> -Infektionen
Cyclosporin A	Arzneistoff	inhibiert fMLF-stimulierte Degranulation, Chemotaxis und Calcium-Mobilisierung bei PMN
tBOC	als Ersatz der N-Fomyl-Gruppe von fMLP	verringert die PMN-Aktivierung
Cyclosporin H	Arzneistoff	verringert die PMN-Aktivierung
DCA	Desoxycholsäure; sekundäre Gallensäure	inhibiert fMLF-stimulierte Degranulation, Chemotaxis und Calcium-Mobilisierung bei PMN und Monozyten

Wie alle GPCRs besteht der FPR1 aus einem extrazellulären N-Terminus, sieben die Plasmamembran durchspannenden α -Helices, vier extra- und vier intrazellulären Schleifen, sowie einem zytosolischen C-Terminus (Abbildung 7) (BOULAY *et al.*, 1990a). Auf der zytosolischen Seite besteht eine Bindung des Rezeptors mit den pertussistoxin-sensitiven G_i -Proteinen $G_{i\alpha_1}$, $G_{i\alpha_2}$ und $G_{i\alpha_3}$ (WENZEL-SEIFERT *et al.*, 1999). Bei der Bindung eines N-Formyl-Peptids wie beispielsweise N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) kommt es zu einer Konformationsänderung des FPR1. Dadurch wird das Signal an das heterotrimere G-Protein weitergeleitet, welches rasch in eine α - und eine $\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziiert (YANG *et al.*, 2008; FU *et al.*, 2004).

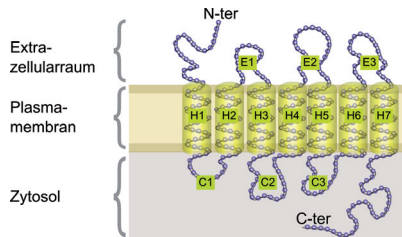


Abb. 7: **Schematische Darstellung des menschlichen FPR1 in der Plasmamembran.** Alle Rezeptoren dieser Familie besitzen einen N- und einen C-Terminus, sieben transmembranäre α -helicale Regionen (H1-H7), drei extrazelluläre Schleifen (E1-E3) und drei zytosolische Schleifen (C1-C3). (nach BOULAY *et al.* 1990)

Die $\beta\gamma$ -Untereinheit reguliert Phospholipase $C\beta$ -Isoforme in Leukozyten und stimuliert die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) (BLANK *et al.*, 1992; CAMPS *et al.*, 1992; PARK *et al.*, 1993). Die Aktivierung der Phospholipase $C\beta$ (PLC) führt zur Konversion von Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP₂) in Phosphatidylinositol-1,4,5-triphosphat (PIP₃) (YANG *et al.*, 2008). PLC bewirkt weiterhin die Spaltung von PIP₃, wodurch Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) gebildet werden. Diese beiden Produkte besitzen wichtige Funktionen als Sekundärbotenstoffe, da IP₃ Ca²⁺-Ionen aus intrazellulären Depots freisetzt und DAG in Verbindung mit Ca²⁺-Ionen diverse Isoformen der Proteinkinase C (PKC) aktiviert (BOKOCH, 1995; MIGEOTTE *et al.*, 2006). Die Aktivierung von PKC, ebenso wie die Aktivierung verschiedener Ca²⁺-sensitiver Proteinkinasen, katalysiert die Proteinphosphorylierung, welche für das Einsetzen unterschiedlicher Neutrophilenfunktionen verantwortlich gemacht wird (BOKOCH, 1995). Die FPR1-Signalkaskade ist im Detail ausgesprochen komplex. Zu den an den FPR1 gekoppelten intrazellulären Effektoren gehören beispielsweise Tyrosinkinase (TK), mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPKs), Phospholipase A2 und D (SELVATICI *et al.*, 2006; LE *et al.*, 2002; MIGEOTTE *et al.*, 2006). Die Abbildung 8 zeigt eine Übersicht der bisher bekannten Mechanismen der Signaltransduktion der Formyl-Peptid-Rezeptoren. Die Aktivierung der Formyl-Peptidrezeptoren auf PMN kann neben der Chemotaxis auch weitere Funktionen, wie z.B. Aggregation, Phagozytose, Bildung zytotoxischer Superoxidanionen, Synthese bioaktiver Arachidonmetabolite und Freisetzung proteolytischer Enzyme bewirken (RADEL *et al.*, 1994).

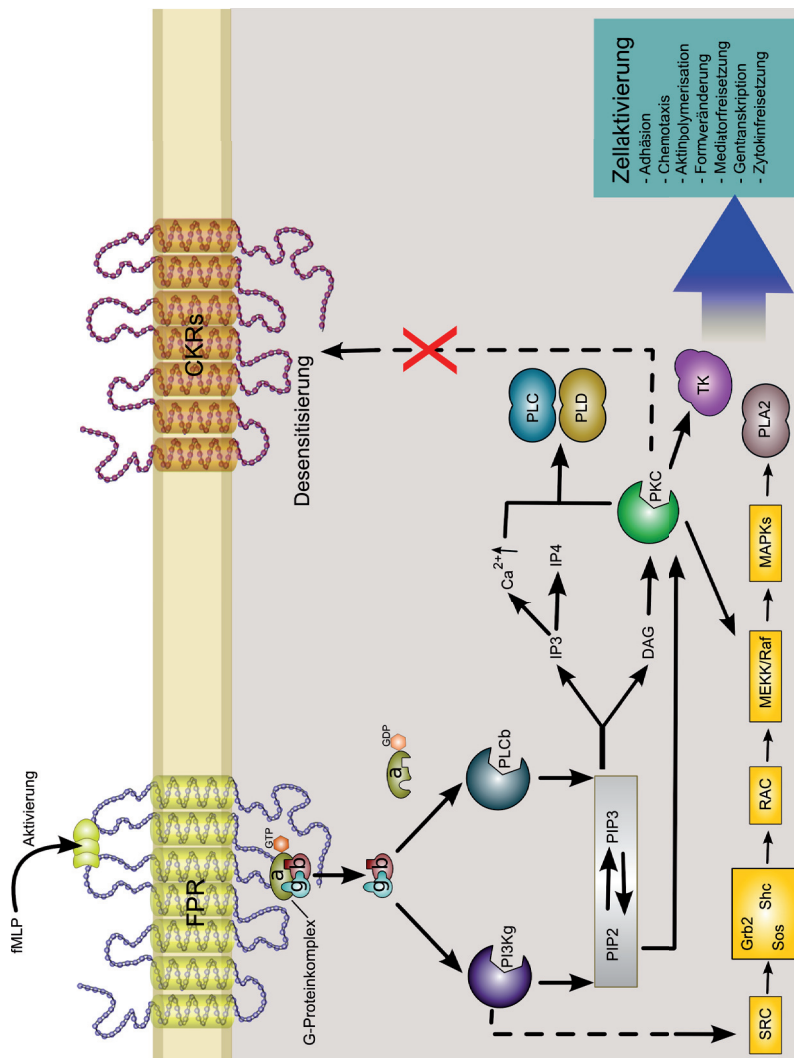


Abb. 8: **Signaltransduktion bei Formylpeptid-Rezeptoren.** Pl3K, Phosphoinositid-3-Kinase; PLC, Phospholipase C; DAG, Diacylglycerol; IP₃, Inositol-Triphosphat; PLA, Phospholipase A; PLD, Phospholipase D; PKC, Protein kinase C; TK, Tyrosinkinase; MAPK, mitogenaktivierte Proteinkinase; Rac, Rac-Guaninrintriphosphatfamilie; SRC, Tyrokinase SRC; (modifiziert nach LE et al. 2002 und YANG et al. 2008)

1.6 Polymorphismen des Formyl-Peptid-Rezeptors 1 bei der aggressiven Parodontitis

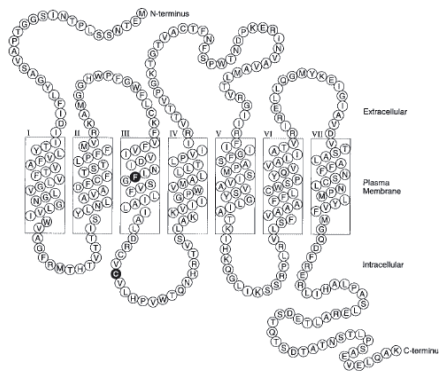


Abb. 9: **Schematische Darstellung des FPR1.** Die nachgewiesenen Veränderungen in der Aminosäure-Sequenz sind dunkel dargestellt. (GWINN et al. 1999)

Ein Reihe von Autoren hat einen Zusammenhang zwischen der veränderten Chemotaxis polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten und der aggressiven Parodontitis beschrieben (CLARK *et al.*, 1977; DANIEL *et al.*, 1993; DENARDIN *et al.*, 1990; GWINN *et al.*, 1999; JONES *et al.*, 2003; KINANE *et al.*, 1989; TUFANO *et al.*, 1992; ZHANG *et al.*, 2003).

PEREZ et al. (PEREZ *et al.*, 1991) untersuchten PMN-Funktionen eines an juveniler Parodontitis leidenden 22-jährigen Europäers. Die PMN wurden aus venösem Blut isoliert. Um die Chemokinese und die Chemotaxis der Zellen zu studieren, wurden die Zellen in modifizierten Boyden-Kammern mit C5a und fMLP stimuliert. Die Freisetzung von Lysozym und Beta-Glucuronidase wurden an PMN untersucht, die mit Cytocholasin B behandelt worden waren. Zusätzlich wurde die Produktion von Superoxidanionen bestimmt. Darüber hinaus wurde die Bindung von Formyl-Peptiden an Formyl-Peptid-Rezeptoren auf PMN mit Hilfe von mit Iod-125 markiertem N-formyl-Nle-leu-phe-tyr analysiert. Um die Eigenschaften der Formyl-Peptid-Rezeptoren weiter zu untersuchen, wurden diese enzymatisch mit N-Glykanase und Papain behandelt.

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigten, dass die Stimulierung mit fMLP nicht zu Chemotaxis führte, während die Stimulierung mit C5a eine normale chemotaktische Reaktion auslöste. Die verminderte Reaktion auf Stimulierung mit fMLP war jedoch nur auf die Chemotaxis beschränkt. Die PMN waren weiterhin zur Degranulierung und zur Herstellung von Superoxidanionenradikalen in der Lage. Die Ligandenbindungsanalyse zeigte, dass die PMN des Patienten 42% weniger FPR1 aufwiesen als die eines gesunden Probanden. Die Dissoziationskonstanten und die Anzahl der FPR2/ALX waren hingegen gleich. Der Verdau mit N-Glykanase zeigte keinen Unterschied im Grad der Glykosylierung der Formyl-Peptid-Rezeptoren zwischen den PMN des Patienten und denen des Probanden. Beim Verdau mit Papain waren die Formyl-Peptid-Rezeptoren des Patienten resistenter.

Die Arbeitsgruppe vermutete einen Defekt im Proteingerüst oder eine veränderte Struktur zumindest eines der beiden Formyl-Peptid-Rezeptoren auf PMN, welcher für die veränderten Eigenschaften der Zellen verantwortlich war.

GWINN *et al.* (GWINN *et al.*, 1999) untersuchten 30 Patienten mit lokalisierter juveniler (LJP) und lokalisierter post-juveniler Parodontitis (post-LJP), fünf Patienten mit generalisierter juveniler Parodontitis, 31 Patienten mit adulter Parodontitis und 20 parodontal gesunde Kontrollen mittels Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analysen (single strand conformation polymorphism; SSCP) und Sequenzierung auf Unterschiede in der FPR1-DNA, welche aus PMN isoliert worden war.

Bei 29 der 30 Patienten mit LJP und post-LJP zeigten sich veränderte SSCP-Muster. In den anderen Gruppen gab es hingegen keine Auffälligkeiten. Die Sequenzierung ergab, dass in der Gruppe der LJP- und post-LJP-Patienten bei 17 Patienten die Substitution von Thymin gegen Cytosin an der Base 329 und bei fünf Patienten eine Substitution von Cytosin gegen Guanin an der Base 378 des für den FPR1 kodierenden Gens vorlag. Eine Kombination beider Substitutionen wurde bei weiteren sieben Patienten nachgewiesen.

Die Punktmutation (single nucleotide polymorphism; SNP) an der Base 329 führt zum Austausch von 110Phe→Ser im FPR1, GWINN *et al.* deuteten einen Effekt auf die Struktur und Funktion des Rezeptors, da beide Aminosäuren ganz unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Der SNP an der Base 378 führt zum Austausch von 126Cys→Trp im FPR. Die Arbeitsgruppe vermutete hierbei Konsequenzen für die Interaktion mit dem G-Proteinkomplex, da 126Cys in der zweiten intrazellulären Schleife des FPR1 lokalisiert ist, einer Struktur, die für die Bindung von G-Proteinen als wichtig gilt.

Basierend auf den Ergebnisse von GWINN *et al.* (GWINN *et al.*, 1999) stellten SEIFERT *et al.* (SEIFERT und WENZEL-SEIFERT, 2001) die Hypothese auf, dass die Ursache für LJP in einem Defekt der G_i -Protein-Kopplung des FPR1 liegt. Sie führten In-vitro-Versuche an transfizierten Sf9-Insekten-Zellen, welche den FPR1-Wildtyp, die F110S- oder die C126W-Mutation exprimierten.

Die Ergebnisse zeigten, dass die F110S-Mutation in der dritten transmembranen Domäne und die C126W-Mutation in der zweiten intrazellulären Schleife des FPR1 zu einem annähernd bzw. vollständigen Defekt der G_i -Protein-Bindung am Rezeptor führen. Dieser Bindungsdefekt ist mit dem Verlust der konstitutiven Aktivität des FPR1 assoziiert. Der Austausch von hydrophobem Phenylalanin gegen hydrophiles Serin an der Proteinposition 110 könnte die Ausbildung einer alpha-helicalen Struktur behindern und somit die Ligandenaffinität des Rezeptors reduzieren. SEIFERT *et al.* erklärten den vollständigen Defekt der G_i -Protein-Kopplung bei der C126W-Mutation damit, dass diese Mutation die Struktur des Rezeptor grundlegend verändern könnte.

JONES *et al.* (JONES *et al.*, 2003) experimentierten mit chinesischen Hamster-Ovar-Zellen (CHO), die zuvor mit wtFPR, FPR-110Phe→Ser, FPR-126Cys→Trp oder FPR-110Phe→Ala transfiziert worden waren. Um die chemotaktischen Eigenschaften der CHO zu untersuchen, wurden diese mit fMLP stimuliert. Die Oberflächenexpression und die Ligandenbindungsaffinität der Rezeptoren wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt.

Bei der C126W-Mutation wurde eine 30fach höhere Konzentration an fMLP als beim wtFPR benötigt, um eine optimale Chemotaxis zu erreichen. Die optimale Chemotaxis des FPR-126Cys→Trp betrug dennoch nur 30% der optimalen Chemotaxis des wtFPR. Chemotaxis-Tests konnten bei der 110S-Mutation nicht durchgeführt werden, da keine signifikante Oberflächenexpression des FPR-110Phe→Ser auf den CHO vorlag. JONES et al. führten dies auf eine fehlerhafte Faltung des Proteins im In-vitro-Versuch zurück. PMN besitzen spezielle Chaperone, die nur in diesen Zellen vorkommen, die es wahrscheinlich möglich machen, dass der FPR-110Phe→Ser exprimiert wird.

ZHANG et al. (ZHANG *et al.*, 2003) konnten nach Untersuchungen an 111 Patienten unterschiedlicher ethnischer Herkunft, die an AP erkrankt waren, im Vergleich mit einer Kontrollgruppe von 115 Personen weder den SNP c.329T>C noch den SNP c.378C>G im *FPR1*-Gen nachweisen. Damit widersprechen diese Ergebnisse der Hypothese, dass die Ätiologie der AP mit diesen beiden SNPs im *FPR1*-Gen und somit mit den Polymorphismen 110Phe→Ser und 126Cys→Trp im *FPR1* assoziiert ist.

Bei der Gensequenzanalyse des *FPR1*-Gens von Base 250 bis 615 wurden die SNPs c.301G>C, c.306T>C, c.348T>C, c.546C>A, c.568A>T und c.576T>C>G bei Patienten mit AP nachgewiesen. Die SNPs an den Nucleotid-Positionen 301, 568 und 576 bewirken eine Veränderung der kodierten Aminosäure. Der Basentausch von Adenin gegen Thymin an der Nucleotid-Position 568 führt dazu, dass die unpolare Aminosäure Tryptophan anstelle der geladenen polaren Aminosäure Arginin an Position 190 des *FPR1* eingebaut wird. Der Basentausch von Guanin gegen Thymin oder Cytosin an der Nucleotid-Position 576 führt dazu, dass die geladene polare Aminosäure Lysin anstelle der ungeladenen polaren Aminosäure Asparagin an Position 192 des *FPR1* eingebaut wird. Der SNP c.301G>C bewirkt zwar einen Austausch von Leucin gegen Valin an Position 101 des *FPR1*, beide Aminosäuren sind jedoch unpolar.

ZHANG et al. fanden eine signifikante Assoziation der nicht-synonymen SNPs c.568A>T und c.576T>C>G mit der Gruppe der afroamerikanischen AP-Patienten ($p = 0,0033$ und $p = 0,0018$). Nach der Meinung der Autoren besitzen beide Mutationen das Potenzial die Liganden-Bindungsspezifität und/oder die Bindungsaffinität des *FPR1* zu verändern.

GUNJI et al. (GUNJI *et al.*, 2007) untersuchten in einer Assoziationsstudie das *FPR1*-Gen bei 49 japanischen Patienten mit AP und 373 ethnisch übereinstimmenden gesunden Kontrollen. Dabei wurde bei 24 AP-Patienten und 24 Kontrollen die gesamte 21.1-kb-Genregion mit allen Exons und Introns, sowie 10 kb der 5'-flankierenden und 5 kb der 3'-flankierenden Region des *FPR1* durch Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction; PCR) mit 13 Primerpaaren amplifiziert und anschließend sequenziert. Bei den übrigen AP-Patienten und 349 Kontrollen erfolgte eine Genotypisierung der entdeckten SNPs durch PCR und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analysen. Die *FPR1*-Genexpression wurde durch Reverse-Transcriptase-PCR (RT-PCR) quantifiziert.

In dieser Studie konnten 30 Variationen des *FPR1*-Gens (fpr1-01 bis fpr1-30) nachgewiesen werden, von denen sich 11 in der kodierenden, acht in der 5'-flankierenden und 11 in der 3'-flankierenden Region befanden. Fünf SNPs (-12915C>T, -10056T>C, -8430A>G, 301G>C und 546C>A) waren mit AP assoziiert. Der funktionelle SNP fpr1-01

(-12915C>T) ging mit einer geringeren Expression von *FPR1*-Transkripten einher. Durch die Kopplungsungleichgewicht-Analyse (linkage disequilibrium; LD) konnten vier Hoch-LD-Gruppen identifiziert werden. Die Haplotypen-Assoziationsanalyse von acht Haplotypen zeigte eine globale Signifikanz und eine erhöhte Präsenz des Haplotyps I (fpr1-01T-fpr1-12G-fpr1-14C) in der Patientengruppe.

MANEY et al. (MANEY und WALTERS, 2009) untersuchten bei 30 afroamerikanischen Patienten mit AP und 33 afroamerikanischen Kontrollen, sowie 75 türkischen AP-Patienten und 63 türkischen Kontrollen das *FPR1*-Gen im offenen Leserahmen (open reading frame; ORF) auf das Vorhandensein von SNPs. Durch PCR und anschließende Sequenzierung konnten die SNPs c.301G>C, c.306T>C, c.348T>C, c.546C>A, c.568A>T und c.576T>C>G nachgewiesen werden. Der SNP c.306T>C lag nur in der türkischen Population vor. Es bestand eine Assoziation zwischen dem 348T-Allel und einem erhöhten Risiko für AP in der Gruppe der Afroamerikaner. Die Haplotypen 348T.568A, 348T.576T und 348T.568A.576T waren bei den afroamerikanischen Patienten mit AP signifikant erhöht, während die Haplotypen 348C.568A, 348C.576T und 348C.568A.576T in der Kontrollgruppe häufiger vorkamen. In der türkischen Population konnte kein SNP mit dem Krankheitsbild in Verbindung gebracht werden.

Die Arbeitsgruppe vermutete, dass der synonyme SNP c.348T>C einen Einfluss auf die *FPR1*-Genexpression besitzen könnte, die aus Unterschieden der Sekundärstruktur der mRNA herrührt.

Um den Einfluss des 348T-Allels auf die PMN-Funktion bei Afroamerikanern zu klären, führten MANEY et al. (MANEY *et al.*, 2009) eine Folgestudie durch. Bei 26 AP-Patienten und 32 Kontrollen wurden PMN aus venösem Blut isoliert und ihre Chemotaxis mit fMLF in modifizierten Boyden-Kammern untersucht. Bei 26 Patienten mit AP und 37 Kontrollen wurde RNA aus PMN isoliert und cDNA synthetisiert. Anschließend wurden die cDNA-Proben durch Real-Time-PCR quantitativ analysiert. Bei 37 Patienten und 38 Kontrollen wurden 439 Basenpaare des *FPR1*-Gens sequenziert.

Die Chemotaxis war bei den AP-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen bei der Stimulation mit fMLF in Abhängigkeit von der Konzentration um 19 bis 22% reduziert. Die zufällige Migration unterschied sich zwischen Patienten und Kontrollen nicht. Insgesamt war die *FPR1*-Genexpression bei den Patienten geringer als bei den Kontrollen. Auf der Ebene der Genotypen gab es bei der Genexpression der Patienten keinen Unterschied für den 348T/T-Genotyp im Vergleich mit Patienten und Kontrollen mit dem 348C/C- oder 348T/C-Genotyp. Die unterschiedlichen Genotypen waren hingegen mit der Chemotaxis der PMN assoziiert. Bei Individuen mit dem 348T/T-Genotyp war die Chemotaxis 26% geringer als bei Individuen mit dem 348T/C-Genotyp bzw. 33% geringer als bei Individuen mit dem 348C/C-Genotyp.

Da es sich bei c.348T>C um einen synonymen SNP handelt, konnten die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht auf eine Veränderung auf Proteinebene zurückgeführt werden. Daher vermuteten MANEY et al. eine Assoziation zu anderen SNPs in der Promotorregion oder der Enhancer-Region. Dies wurde zwar untersucht, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

2 Ziele der Studie

Ziel dieser explorativen Studie war es zu untersuchen, ob das humane *FPR1*-Gen bei deutschen Patienten mit aggressiver Parodontitis und bei deutschen parodontal gesunden Kontrollen an den Positionen 301, 306, 329, 348, 378, 546, 568 oder 576 separat Abweichungen vom Wild-Typ aufzeigt und wenn ja, ob das spezifische Auftreten dieser Abweichungen mit einer der beiden Gruppen assoziiert ist.

Die Ergebnisse können wichtige Hinweise auf die Ätiologie der aggressiven Parodontitis liefern und außerdem Möglichkeiten für eine Risikoanalyse der Erkrankung aufzeigen.

Die Hypothese war, dass es Unterschiede beim Auftreten von Mutationen im humanen *FPR1*-Gen bei Patienten mit aggressiver Parodontitis und bei parodontal gesunden Probanden gibt.

Die Nullhypothese war, dass sich das Vorkommen von Mutationen im humanen *FPR1*-Gen bei Patienten mit aggressiver Parodontitis nicht von dem bei parodontal gesunden Probanden unterscheidet.

3 Materialien und Methoden

3.1 Patientenkollektiv und Kontrollgruppe

Patienten, die an einer AP leiden (Patientengruppe), wurden aus dem Patientengut der Poliklinik für Parodontologie der JLU Gießen rekrutiert. Für die Gruppe parodontal gesunder Individuen (Kontrollgruppe) wurde anhand einer Suchmaske eine Abfrage der Patientendatenbank der Poliklinik für zahnärztliche Prothetik der JLU Gießen durchgeführt und so eine Vorauswahl getroffen. Aufgrund der vorhandenen klinischen und röntgenologischen Befunde wurde die Eignung für die Studie evaluiert. Die selektierten Individuen wurden schriftlich zur Teilnahme an der Studie eingeladen. Zusätzlich stellten sich Studenten der Poliklinik für Parodontologie der JLU Gießen zur Verfügung.

3.1.1 Patientenaufklärung

Die Studie wurde von der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der JLU Gießen genehmigt (97/07). Alle Teilnehmer erklärten nach einem Informationsgespräch schriftlich ihr Einverständnis.

3.1.2 Gruppeneinteilung

Es wurden entsprechend den Ein- und Ausschlusskriterien zwei Gruppen gebildet:

1. Patientengruppe: Patienten mit der Diagnose einer AP
2. Kontrollgruppe: parodontal gesunde Probanden ohne Attachmentverlust

3.2 Klinische und röntgenologische Untersuchung

In einem Gespräch wurde zunächst die allgemeinmedizinische Anamnese erhoben und der ethnische Hintergrund erfragt. Anschließend erfolgte eine zahnärztliche Untersuchung unter Erhebung der speziellen parodontologischen Befunde.

3.2.1 Sondierungstiefen und Sondierungsblutungen

Die Sondierungstiefen (ST) wurden an allen Zähnen mit einer UNC-15-Parodontalsonde (Fa. Hu-Friedy, Leimen, Deutschland) als Distanz vom Gingivalrand bis zum Sulkusboden (ARMITAGE, 1995) in Millimetern an sechs Stellen pro Zahn bestimmt (mesio-, centro- und distovestibulär, sowie mesio-, centro- und distooral).

Etwa 30 Sekunden nach dem Sondieren wurde entsprechend des Ja-/Nein-Prinzips das Auftreten von Sondierungsblutungen (BOP; bleeding upon probing) bestimmt.

3.2.2 Gingivale Rezessionen

Gingivale Rezessionen (GR) wurden ebenso in Millimetern als Strecke von der Schmelz-Zementgrenze bis zum Gingivalrand an sechs Stellen pro Zahn (mesio-, centro- und

distovestibulär, sowie mesio-, centro- und distoorale) ermittelt (ARMITAGE, 2004). Lag die Schmelz-Zementgrenze supragingival, wurde GR mit einem negativen Vorzeichen versehen. GR wurde mit einem positiven Vorzeichen versehen, wenn die Schmelz-Zementgrenze subgingival lag.

3.2.3 Klinischer Attachmentlevel

Der klinische Attachmentlevel (CAL) ist die Distanz von der Schmelz-Zement-Grenze bis zum sondierbaren Boden des Sulcus gingivae (ARMITAGE, 2004). CAL wurde als Differenz von ST und GR rechnerisch an sechs Stellen pro Zahn bestimmt.

3.2.4 Plaqueindex

Das Vorhandensein von Plaque auf den Zahnoberflächen wurde mit einem Plaqueindex, der dem Plaque control record nach O'Leary entspricht (O'LEARY *et al.*, 1972), bestimmt. Dazu wurden die Zahnbeläge mit einem Plaquerevelator (Mira-2-Tone®, Bestell-Nr.: 605 659, Hager & Werken GmbH & Co. KG, Duisburg) angefärbt. Anschließend wurde der Plaquebefall an vier Stellen je Zahn (mesial, vestibulär, distal, oral) erfasst und der PLI nach der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der positiven Messstellen}}{\text{Anzahl der Messstellen}} \bullet 100 = \text{Plaquebefall in Prozent}$$

3.2.5 Modifizierter Papillen-Blutungsindex nach Saxer und Mühlemann

Um Aufschluss über den Entzündungszustand der marginalen Gingiva zu gewinnen, wurde ein modifizierter Sulkus-Blutungs-Index (SBI) (LANGE, 1981) erhoben. Der SBI wurde im 1. und 3. Quadranten von oral und im 2. und 4. Quadranten von vestibulär an den Zahnfleischpapillen erhoben. Das Untersuchungsgebiet wurde zunächst mit einem Luftbläser getrocknet. Anschließend wurde eine stumpfe Sonde im Approximalbereich der Zähne etwa 0,5 mm in den Sulkus eingeführt und die Zahnfleischpapillen von der Basis zur Spitze ausgestrichen. Das Sondenende lag dabei der Zahnoberfläche an. Nach etwa 30 Sekunden wurde als Ja-/Nein-Entscheidung festgehalten, ob eine Blutung auftrat oder nicht.

Die Berechnung des SBI erfolgte nach der Formel:

$$\frac{\text{Anzahl der Zahnfleischpapillen mit Blutung}}{\text{Anzahl der Messstellen}} \bullet 100 = \text{SBI in Prozent}$$

3.2.6 Röntgenbefund

Anhand geeigneter Röntgenbilder (Orthopantomogramm oder Zahnfilme in Rechtwinkels-technik), die nicht älter als sechs Monate waren, wurde untersucht, ob eine Destruktion alveolären Knochens vorlag. Dazu wurde der Abstand von der Crista alveolaris bis zur Schmelz-Zementgrenze beurteilt. Der röntgenologische Alveolarknochenlevel (ABL) beschreibt das Verhältnis der Distanz zwischen Schmelz-Zementgrenze und Crista alveolaris

zur Distanz zwischen Schmelz-Zementgrenze und Wurzelspitze. Longitudinalstudien haben gezeigt, dass der altersbedingte Abbau alveolären Knochens durchschnittlich nicht mehr als 1,01 % ABL bzw. 0,1 mm pro Jahr beträgt (JANSSON *et al.*, 2002; LAVSTEDT *et al.*, 1986; MARKKANEN *et al.*, 1981; ROHNER *et al.*, 1983). Bei gesunden Individuen, die jünger als 30 Jahre sind, beträgt der ABL durchschnittlich etwa 90 % bzw. verläuft die Crista alveolaris nicht mehr als 2 mm apical der Schmelz-Zementgrenze (SALONEN *et al.*, 1991; PAPAPANOU *et al.*, 1988; JANSSON *et al.*, 2002). Zeigt sich bei älteren Individuen ein Höhenverlust des Alveolarknochens über die altersbedingten Veränderungen hinaus, so ist eine entzündlich bedingte Knochendestruktion nicht auszuschließen.

3.3 Ein- und Ausschlusskriterien

3.3.1 Einschlusskriterien

Alle Teilnehmer der Studie gaben an, deutscher Abstammung zu sein.

Patientengruppe: Patienten mit der Diagnose einer AP

Die Kriterien für die Diagnose einer aggressiven Parodontitis entsprachen denen des Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions (LANG, 1999). Die Patienten beiderlei Geschlechts waren bis auf eine Parodontalerkrankung klinisch gesund und hatten mindestens 20 Zähne.

Bei den Patienten mit lokalisierter aggressiver Parodontitis (LAgP) lag der Beginn der Erkrankung vor dem 30. Lebensjahr. An nicht mehr als zwei weiteren Zähnen außer den bleibenden ersten Molaren und Schneidezähnen lagen $ST \geq 5$ mm und $CAL \geq 5$ mm vor. Bei den Patienten mit generalisierter aggressiver Parodontitis (GAgP) lag der Beginn der Erkrankung vor dem 35. Lebensjahr. An mindestens drei weiteren Zähnen außer den bleibenden ersten Molaren und Schneidezähnen lagen $ST \geq 5$ mm und $CAL \geq 5$ mm vor.

Kontrollgruppe: parodontal gesunde Probanden ohne Attachmentverlust

Die Probanden beiderlei Geschlechts hatten mindestens 20 Zähne. An keiner der gemessenen Stellen, außer an den Weisheitszähnen, waren ST und $CAL \geq 4$ mm. Nicht mehr als 25 % der Stellen zeigten eine Blutung auf Sondierung. Röntgenologisch war kein Höhenverlust des Alveolarknochens über das altersbedingte Maß hinaus zu erkennen.

3.3.2 Ausschlusskriterien

Aus der Studie ausgeschlossen wurden Patienten mit folgenden Allgemein- oder systemischen Erkrankungen: Autoimmunerkrankungen wie rheumatische Arthritis, systemischer Lupus erythematodes und Sjögren-Syndrom, Schwangerschaft, Patienten, die in den letzten 9 Wochen vor Probenentnahme eine Antibiose bekommen oder die Immunsuppressiva eingenommen hatten, sowie Patienten mit Hepatitis oder HIV.

3.4 Laboruntersuchungen

3.4.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme wurde durch Punktion der Armvene mit einer 0,9x19mm Multifly®-Kanüle (Bestell-Nr.: 85.1637.035, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) durchgeführt. Eine mit einem roten Deckel gekennzeichnete 7,5ml-S-Monovette® KE (1,6 mg EDTA/ml Blut, Bestell-Nr.: 01.1605.001, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland), eine mit einem weißen Deckel gekennzeichnete 7,5ml-S-Monovette® (Bestell-Nr.: 01.1601.001, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) und eine mit einem violetten Deckel gekennzeichnete 3,5ml-S-Sedivette® (0,105 mol/l Tri-Natriumcitrat/Citronensäure-Puffer-Lösung (pH 5,5) und 0,7 ml Citrat-Puffer-Lösung, Bestell-Nr.: 01.1690.001, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) wurden nach Herstellerangaben mit Vollblut gefüllt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

3.4.2 Bestimmung der Blutsenkungsgeschwindigkeit

Die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) wurde in unserem Labor nach der Westergren-Methode mit einer Senkungspipette (Bestell-Nr.: 86.1996.062, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) bestimmt. Diese Methode wurde vom International Council for Standardization in Haematology (ICSH) empfohlen (STUART, 1993). Wie unter 3.4.1 beschrieben wurden 3,5 ml Blut aus der Armvene in Röhrchen mit 0,105 mol/l Tri-Natriumcitrat/Citronensäure-Puffer-Lösung (pH 5,5) und 0,7 ml Citrat-Puffer-Lösung (S-Sedivette®, Bestell-Nr.: 01.1690.001, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) abgenommen. Das Blut wurde in 300 mm lange, vertikal ausgerichtete Säulen gegeben, so dass es vom Boden des Röhrchens gemessen in eine Höhe von 200 mm reichte. Die Distanz, um die das Blut binnen einer Stunde sank, wurde in mm/h registriert. Normwerte für die Westergren-Methode betragen für Männer 0-15 mm/h, für Frauen 0-20 mm/h und für Kinder 0-10 mm/h.

3.4.3 Blutprobensicherung, Extraktion der DNA aus Blutzellen, Amplifizierung der DNA

Die Extraktion der DNA aus den Blutzellen erfolgte mit FTA® Classic Cards der Firma Whatman (Bestell-Nr.: WB120205, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland).

3.4.3.1 Blutprobensicherung

Die FTA® Cards wurden den jeweiligen Proben entsprechend beschriftet. Blut aus den EDTA-Röhrchen wurde mit einer konzentrisch zirkulierenden Bewegung auf die eingezeichneten Kreise der FTA® Cards pipettiert ($\leq 125 \mu\text{L}$ pro 2,54 cm Kreis; $75 \mu\text{L}$ pro GeneCard-Kreis). Die Proben wurden eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. FTA® Cards, die nicht sofort nach dem Trocknen weiterverarbeitet wurden, wurden bei Raumtemperatur in Umschlägen (Multi-Barrier Pouch (Large), WB100037, Whatman

GmbH, Dassel, Deutschland) mit Trockenmitteln (Desiccant Packets (1gm), WB100003, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) gelagert.

3.4.3.2 Isolierung der DNA

Nach Herstellerangaben wurden mit einer sterilen Stanze und einer zugehörigen Unterlage (Harris Uni-Core 1.2 mm punch, WB100028, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) Plättchen mit einem Durchmesser von 1,2 mm aus den FTA-Card-Kreisen ausgestanzt. Die Plättchen wurden in sterile 1,5ml-Eppendorfgefäße appliziert. 200 µl FTA Purification Reagent (WB120204, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) wurden hinzugefügt. Die Probe wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zwischendurch leicht geschwenkt. Anschließend wurde das FTA Purification Reagent mit einer Pipette entfernt. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Danach wurden 200 µl TE-1-Puffer (10 mM Tris-HCL, 0,1 mM EDTA, pH 8.0) in das Eppendorfgefäß appliziert und die Probe erneut für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Nachdem die gesamte Flüssigkeit abpipettiert worden war, wurde das Plättchen getrocknet. Nach den Herstellerangaben enthielt ein so vorbereitetes Plättchen etwa 5-20 ng DNA. Ein Reaktionsvolumen von 25-50 µL wird für die PCR empfohlen. Das Reaktionsvolumen muss trotz des Vorhandenseins des Plättchens nicht verändert werden. Wenn die anschließende PCR nicht innerhalb der nächsten 3 Stunden durchgeführt werden konnte, wurden die Plättchen bis zu maximal einer Woche in dunkler Umgebung bei 4°C gelagert.

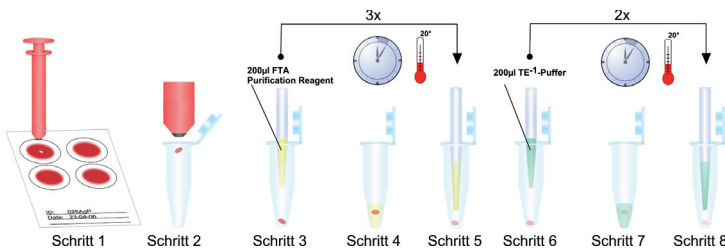


Abb. 10: **Schematische Darstellung der Isolierung der DNA.** Nach der Trocknung der Proben werden Plättchen aus den FTA-Card-Kreisen ausgestanzt. Die Plättchen werden anschließend einer 25-minütigen Waschprozedur unterzogen und dann erneut getrocknet. Die so vorbereiteten Plättchen können umgehend weiterverarbeitet werden.

3.4.3.3 DNA-Amplifizierung

Für die PCR wurden der Mastercycler gradient der Firma Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und das HotStarTaq MasterMix Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. 584bp große DNA-Fragmente zwischen den Nucleotiden 201 und 784 des *FPR1*-Gens wurden mit den bei GWINN et al. (GWINN et al., 1999) beschriebenen Primern FMLP 2F 5'-GGCCGTGGCTGACTTCTG-3' und FMLP 2R 5'-GGCCACCACCTGATATG-3' amplifiziert. Die PCR wurde mit einem nach 3.4.3.2 vorbereiteten FTA-Plättchen (1,2 mm Ø ~5-20 ng DNA) in 100µl Reaktionsvolumen aus 81,5µl Aqua bidest., 10µl 10xPuffer (ent-

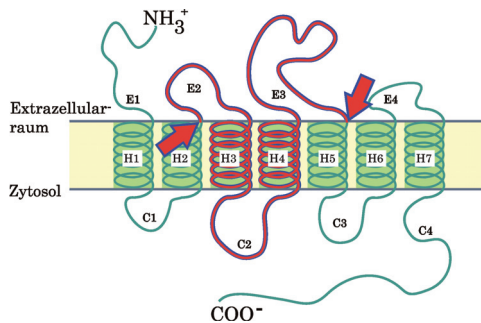


Abb. 11: **Amplifizierter Abschnitt des FPR1.** Die roten Pfeile markieren den Beginn der zweiten extrazellulären Schleife und das Ende der dritten extrazellulären Schleife des FPR1.

hält Tris-Cl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15 mM MgCl₂; pH 8,7 (20°C)), 4 µl MgCl₂-Lösung (25 mM), 0,5 µl jeden dNTPs (je 10 mM), 1 µl jeden Primers (je 0,1 mM) und 2,5 Einheiten Taq-DNA-Polymerase durchgeführt. Die initiale Denaturierung der DNA erfolgte 15 Minuten lang bei 95°C. Darauf folgten 35 Amplifizierungszyklen, die jeweils 60-sekündige Denaturierung bei 94°C, Hybridisierung bei 57°C und Elongation bei 72°C beinhalteten. Am Ende der PCR-Zyklisierung erfolgte eine 10-minütige Extensionsphase bei 72°C.

3.4.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Detektion der Amplifikation wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit 2%igem Agarose-Gel (mit 1xTAE-Puffer angesetzt) in mit 20 µl 1%igem Ethidiumbromid versetzten TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) bei einer Spannung von 80 V für 35 Minuten durchgeführt. Es wurden 12 µl PCR-Produkt jeder Probe und ebenso 1 µl 100bp-DNA-Leiter mit je 1 µl Beschwerungspuffer versetzt und dann das Agarosegel beladen. Nach der Gelelektrophorese wurde mit einem UV-Transilluminator bei 300 nm der Erfolg der PCR überprüft.

3.4.3.5 DNA-Aufbereitung Für die DNA-Aufbereitung wurde das QIAquick PCR Purification Kit (Bestell-Nr.: 28106, QIAGEN, Hilden, Deutschland) verwendet. Je 500 µl PB-Puffer wurden mit je 100 µl PCR-Produkt vermischt. QIAquick-Säulen wurden in 2ml-Sammelröhrchen gesteckt. Das PCR-Puffergemisch wurde dann auf eine QIAquick-Säule aufgetragen und eine Zentrifugation für 60 Sekunden bei 17,900 g (13,000 rpm) durchgeführt. Anschließend wurde der Durchfluss im Sammelröhrchen verworfen. Danach wurden 0,75 ml PE-Puffer auf die QIAquick-Säule aufgetragen und für 60 Sekunden bei 17,900 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Zentrifugation wurde dann ohne zusätzlichen Puffer wiederholt. Daraufhin wurde die QIAquick-Säule auf ein steriles 1,5ml-Eppendorfgefäß gesteckt. Zum Auswaschen der DNA wurden 50 µl EB-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) auf die QIAquick-Säulen aufgetragen und erneut bei denselben Bedingungen zentrifugiert.

3.4.3.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma AGOWA (AGOWA, Gesellschaft für molekularbiologische Technologie mbH, Berlin, Deutschland) mit dem 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in 96well-Mikrotiterplatten pipettiert und mit den benötigten Primern (FMLP 2F 5'-GGCCGTGGCTG-ACTTCTG-3', FMLP 2R 5'-GGGCCACCACCTGATATG-3') an die Firma AGOWA versandt. Die Proben ließen sich über die Position auf der Mikrotiterplatte zuordnen. Die Sequenzierung erfolgte in Sense- und Antisense-Richtung.

3.4.3.7 DNA-Sequenz-Analyse

Die DNA-Sequenz-Analyse erfolgt von Base 250 bis Base 615 des FPR1-Gens im Vergleich mit der Sequenz des wt-FPR1-Gens (GenBank: AY301273.1, GI:31790163). Zur Auswertung wurde das Programm BioEdit (Version 7.0.5, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) eingesetzt. Bei der Heterozygotenanalyse wurde jedes Sequenz-Chromatogramm manuell untersucht.

3.4.3.8 Statistische Auswertungs- und Darstellungsverfahren

Die statistische Auswertung sowie die Darstellung der Ergebnisse in Form von Box-plots und Histogrammen erfolgte mit dem Programm R (Version 2.10.1, <http://www.r-project.org/>). Die Tabellen und Säulendiagramme wurden mit OpenOffice Calc (Version 3.2, <http://de.openoffice.org/>) erstellt. Die Haplotyp-Verteilung wurde mittels FAMHAP untersucht (HEROLD und BECKER, 2009). Dabei wurden alle Mutationskombinationen getestet und ein globaler P-Wert errechnet.

Bei den klinischen Daten wurden die Varianz mit dem Levene-Test und die Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Normalitätstest bestimmt. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen wurden dann mit dem t-Test nach Student analysiert, wenn keine Varianzhomogenität der Stichprobe, aber eine Normalverteilung der Grundgesamtheit vorlagen. Wenn keine Normalverteilung der Grundgesamtheit vorlag, wurde der Wilcoxon-Rangsummentest zur Unterscheidung beider Gruppen angewandt.

Die Heterozygotenfrequenzen wurden auf das Einhalten des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts mit Hilfe eines ternären Plots (GRAFFELMAN und CAMARENA, 2008) und der DeFinetti-Software des Instituts für Humangenetik der GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (<http://ihg.gsf.de>) untersucht. Die Assoziation zwischen dem Haplotyp und der aggressiven Parodontitis wurde mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson getestet. Zur Untersuchung der Allelassoziation mit der Erkrankung wurde Fisher's exakter Test herangezogen.

Bei allen Ergebnissen wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Patientencharakteristika

4.1.1 Alter und Geschlecht

Für die Gruppe I (Patienten mit AP) konnten 54 Patienten im Alter zwischen 15 und 44 Jahre rekrutiert werden. In dieser Gruppe betrug das mittlere Alter $30,33 \pm 6,28$ Jahre und das Medianalter 32 Jahre. Der Anteil der Frauen betrug 64,62 % und der Anteil der Männer 35,19 %.

Für die Gruppe II (parodontal gesunde Probanden ohne Attachmentverlust) wurden 54 Individuen im Alter zwischen 21 und 71 Jahren rekrutiert. Das mittlere Alter betrug $37,22 \pm 13,47$ Jahre und das Medianalter lag bei 31 Jahren. 62,96 % der Probanden waren weiblich und 37,03 % waren männlich.

Im Bezug auf das Alter ($p = 0,08$) und die Geschlechterverteilung ($p = 0,84$) waren beide Gruppen vergleichbar.

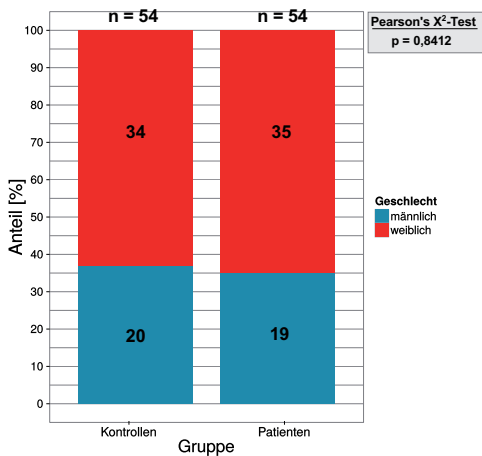


Abb. 12: **Geschlechterverteilung.** Das gestapelte Säulendiagramm zeigt sowohl den prozentualen Anteil als auch die Anzahl weiblicher und männlicher Individuen in beiden Gruppen an. Die Geschlechterverteilung wurde mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson verglichen.

Tabelle 4: **Altersverteilung**

	Mean	Sd	Min.	1. Quartil	Median	3. Quartil	Max.	Wilcoxon rank-sum test
Kontrollen	37,22	13,47	21	28	31	47	71	p = 0,07959
Patienten	30,33	6,28	15	26,25	32	35	44	

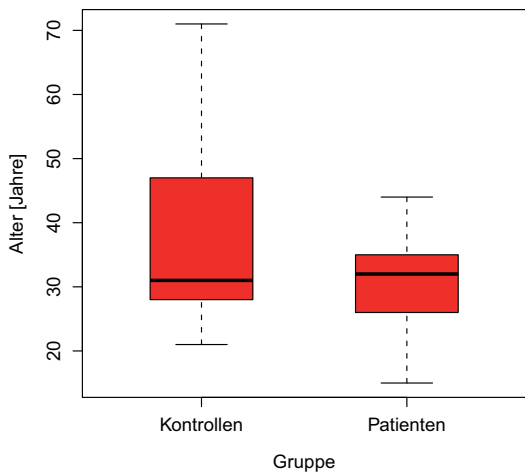


Abb. 13: **Altersverteilung.** Die Altersverteilung in beiden Gruppen wird mit Boxplots nach Tukey dargestellt. Während das Minimum und das Maximum beider Boxplots jeweils sichtlich unterschiedlich sind, sind die Mediane annähernd gleich.

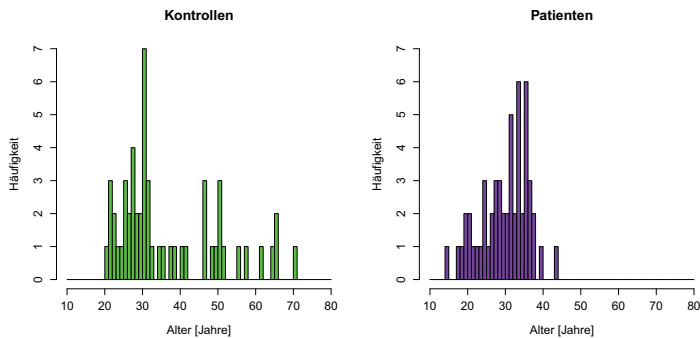


Abb. 14: **Häufigkeit eines bestimmten Alters in Jahren.** Die Häufigkeit eines bestimmten Alters wird anhand von Säulendiagrammen dargestellt. Das linke Säulendiagramm zeigt die Auswertung für die Kontrollgruppen (grün), das rechte die der Patientengruppe (violett).

4.1.2 Anzahl der Zähne

Die durchschnittliche Anzahl der Zähne lag in der Patientengruppe bei $27,98 \pm 2,45$ und in der Kontrollgruppe bei $27,43 \pm 2,01$. In beiden Gruppen war die durchschnittliche Anzahl von Zähnen annähernd gleich ($p = 0,2$).

Beim Fehlen von Zähnen außer den Weisheitszähnen wurde in der Kontrollgruppe nach dem Grund für den Zahnverlust gefragt. Als Gründe wurden Karies ($n = 7$), kieferorthopädische Behandlung ($n = 6$), verlagerte bzw. retinierte Zähne ($n = 2$), Trauma ($n = 2$), Nichtanlage ($n = 1$), missglückte endodontische Behandlung ($n = 1$) und Zahnentfernung auf Grund eines Tumors ($n = 1$) genannt. Bei den Individuen, denen der Grund für das Fehlen von Zähnen unbekannt war ($n = 6$), konnte die Zahnentfernung aufgrund einer parodontalen Erkrankung ausgeschlossen werden.

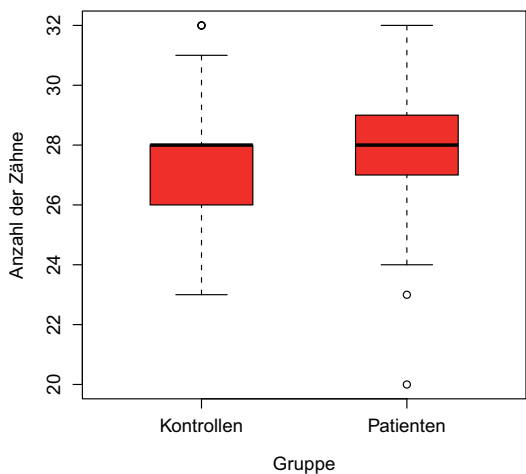


Abb. 15: **Anzahl der Zähne.** Die Anzahl der Zähne je Individuum wird für die Kontrollgruppe und die Patientengruppe mittels Boxplot nach Tukey dargestellt.

Tabelle 5: **Anzahl der Zähne**

	Mean	Sd	Min.	1. Quartil	Median	3. Quartil	Max.	Wilcoxon rank-sum test
Kontrollen	27,43	2,01	23	26,25	28	28	32	p = 0,2083
Patienten	27,98	2,45	20	27	28	29	32	

4.1.3 Sondierungstiefen und klinischer Attachmentlevel

In epidemiologischen Studien über Parodontitis gehören der klinische Attachmentlevel und Sondierungstiefen bis heute zu den gebräuchlichsten klinischen Untersuchungsmethoden (SAVAGE *et al.*, 2009).

In der Patientengruppe lag die durchschnittliche Sondierungstiefe bei $3,75 \pm 1,10$ mm mit einem Minimum von 1,51 mm und einem Maximum von 6,75 mm. Der klinische Attachmentlevel betrug durchschnittlich $4,05 \pm 1,50$ mm mit einem Minimum von 1,7 mm und

einem Maximum von 9,25 mm.

Die durchschnittliche Sondierungstiefe von $1,90\text{ mm} \pm 0,22\text{ mm}$ in der Kontrollgruppe war signifikant geringer ($p < 0,0001$) als in der Patientengruppe. Das Minimum lag bei 1,49 mm und das Maximum lag bei 2,55 mm. Entsprechend war in der Kontrollgruppe auch der durchschnittliche klinische Attachmentlevel von $1,98 \pm 0,26\text{ mm}$ signifikant kleiner ($p < 0,0001$) als in der Patientengruppe. Im Minimum betrug der klinische Attachmentlevel in der Kontrollgruppe 1,57 mm und im Maximum 2,80 mm.

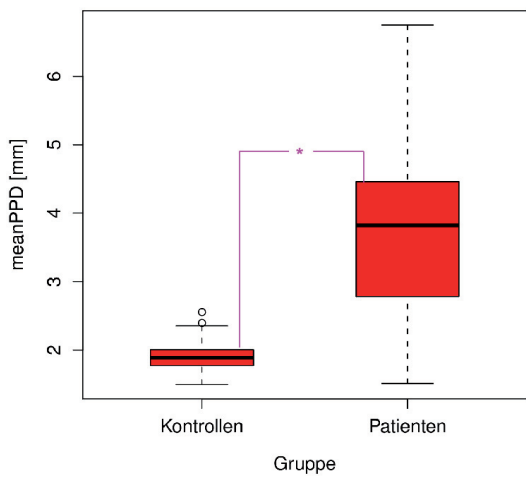


Abb. 16: **Sondierungstiefen.** Die durchschnittliche Sondierungstiefe (meanPPD) wird für die Kontrollgruppe und die Patientengruppe mittels Boxplot nach Tukey dargestellt; *: eindeutiger Unterschied (Student's t-Test, $p < 0,0001$)

Tabelle 6: **Sondierungstiefen in Milimetern**

	Mean	Sd	Min.	1. Quartil	Median	3. Quartil	Max.	Student's t-test
Kontrollen	1,90	0,22	1,49	1,78	1,89	2	2,55	$p < 0,0001$
Patienten	3,75	1,10	1,51	2,78	3,82	4,45	6,75	

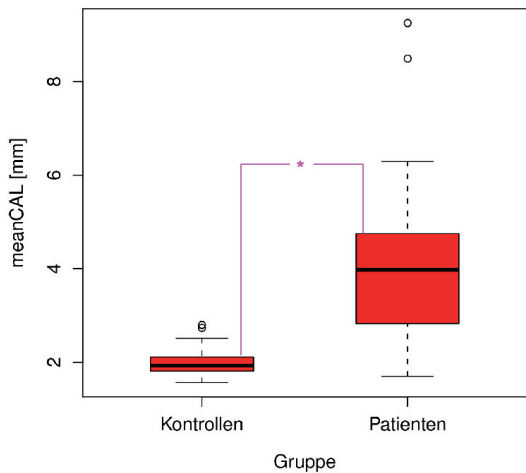


Abb. 17: **Klinischer Attachmentlevel.** Der durchschnittliche klinische Attachmentlevel (mean-CAL) wird für die Kontrollgruppe und die Patientengruppe mittels Boxplot nach Tukey dargestellt; *: eindeutiger Unterschied (Wilcoxon rank-sum test, $p < 0,0001$)

Tabelle 7: **Klinischer Attachmentlevel in Millimetern**

	Mean	Sd	Min.	1. Quartil	Median	3. Quartil	Max.	Wilcoxon rank-sum test
Kontrollen	1,98	0,26	1,57	1,81	1,93	2,11	2,80	p<0,0001
Patienten	4,05	1,50	1,7	2,83	3,97	4,73	9,25	

4.1.4 Sondierungsblutungen

Bei den Sondierungsblutungen zeigten sich eindeutige Unterschiede zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe ($p < 0,0001$). In der Patientengruppe zeigten im Mittel $52 \pm 28\%$ der untersuchten Stellen Blutung auf Sondieren. In der Kontrollgruppe waren es hingegen nur $14 \pm 7\%$ der untersuchten Stellen.

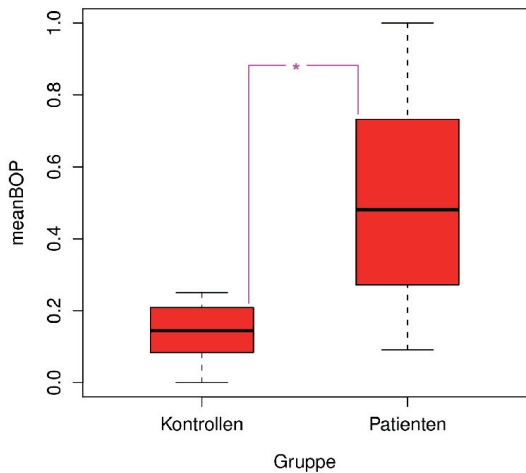


Abb. 18: **Sondierungsblutungen.** Die durchschnittlichen Sondierungsblutungen (meanBOP) werden für die Kontrollgruppe und die Patientengruppe mittels Boxplot nach Tukey dargestellt; *: eindeutiger Unterschied (Wilcoxon rank-sum test, $p < 0,0001$)

Tabelle 8: **Sondierungsblutungen**

	Mean	Sd	Min.	1. Quartil	Median	3. Quartil	Max.	Wilcoxon rank-sum test
Kontrollen	0,14	0,07	0	0,08	0,14	0,2068	0,25	$p < 0,0001$
Patienten	0,52	0,28	0,09	0,28	0,48	0,7266	1	

4.1.5 Plaqueindex

In der Patientengruppe waren durchschnittlich an $49 \pm 24\%$ der Untersuchungsstellen Beläge zu erkennen. In der Kontrollgruppe war der Plaqueindex mit $69 \pm 17\%$ signifikant höher ($p < 0,0012$).

Der Plaqueindex gibt einen qualitativen Aufschluss über die häusliche Mundhygiene des Untersuchten und damit über dessen Fähigkeit, Zahnbeläge effektiv von den Zahnflächen zu entfernen. Die Befunde stellen insgesamt lediglich Momentaufnahmen dar, und geben keine Auskunft über das Mundhygieneverhalten über einen längeren Zeitraum von beispielsweise Tagen oder Wochen.

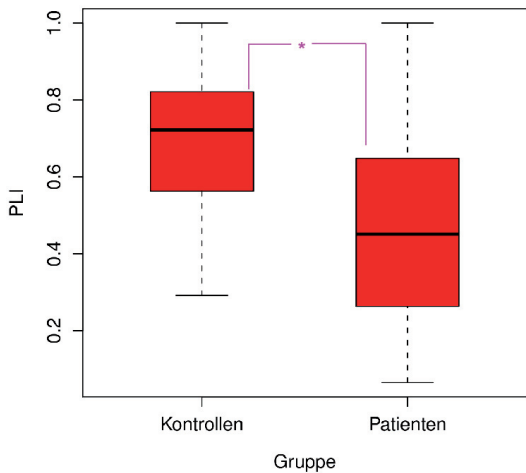


Abb. 19: **Plaquesindex**. Der Plaquesindex (PLI) wird für die Kontrollgruppe und die Patienten-
gruppe mittels Boxplot nach Tukey dargestellt; *: eindeutiger Unterschied (Student's t-Test,
p<0,001)

Tabelle 9: **Plaquesindex**

	Mean	Sd	Min.	1. Quartil	Median	3. Quartil	Max.	Student's t-test
Kontroll	0,69	0,17	0,29	0,5685	0,72	0,8147	1	p<0,0012
Patienten	0,49	0,24	0,065	0,27475	0,45	0,6436	1	

4.1.6 Papillenblutungsindex

In der Patientengruppe konnte an 23 ± 26 % der befundeten Zahnfleischpapillen eine Blutung festgestellt werden. In der Kontrollgruppe waren es dagegen mit 9 ± 9 % eindeutig weniger (p < 0,0042).

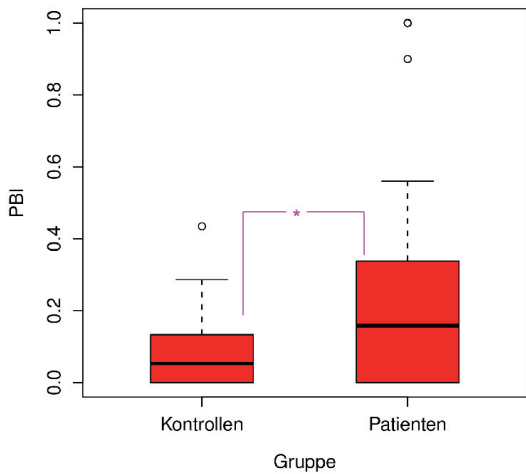


Abb. 20: **Papillenblutungsindex**. Der Papillenblutungsindex (PBI) wird für die Kontrollgruppe und die Patientengruppe mittels Boxplot nach Tukey dargestellt; *: eindeutiger Unterschied (Wilcoxon rank-sum test, $p < 0,01$)

Tabelle 10: **Papillenblutungsindex**

	Mean	Sd	Min.	1. Quartil	Median	3. Quartil	Max.	Wilcoxon rank-sum test
Kontrollen	0,09	0,09	0	0	0,05	0,1326	0,43	p<0,01
Patienten	0,23	0,26	0	0,01	0,16	0,336	1	

4.1.7 Blutsenkungsgeschwindigkeit

Die Blutsenkungsgeschwindigkeit wurde nach einer und nach zwei Stunden gemessen. Nach einer Stunde betrug die mittlere BSG in der Patientengruppe $9,24 \pm 6,75$ mm und in der Kontrollgruppe $7 \pm 4,36$ mm. Nach zwei Stunden zeigten sich bei der BSG deutliche Unterschiede zwischen beiden Gruppen ($p < 0,0105$). Die BSG in der Patientengruppe lag im Mittel bei $19,24 \pm 13,27$ mm und war damit deutlich höher als in der Kontrollgruppe ($13,35 \pm 7,14$ mm).

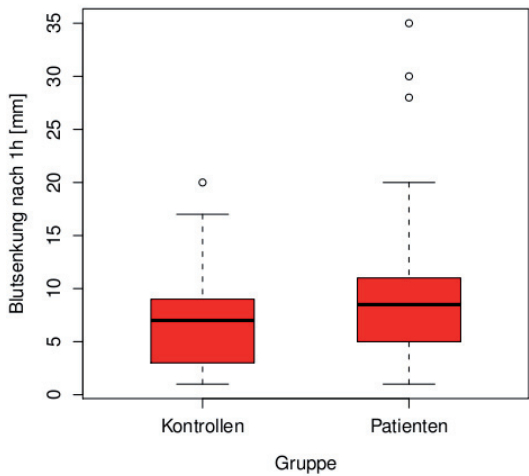


Abb. 21: **Blutsenkungsgeschwindigkeit nach einer Stunde.** Die Blutsenkung nach einer Stunde wird für die Kontrollgruppe und die Patientengruppe mittels Boxplot nach Tukey dargestellt.

Tabelle 11: **Blutsenkungsgeschwindigkeit nach einer Stunde**

	Mean	Sd	Min.	1. Quartil	Median	3. Quartil	Max.	Wilcoxon rank-sum test
Kontrollen	7	4,36	1	3,25	7	9	20	p = 0,063
Patienten	9,24	6,75	1	5	8,5	11	35	

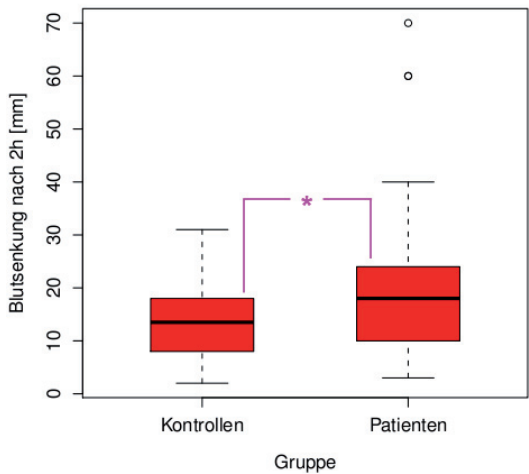
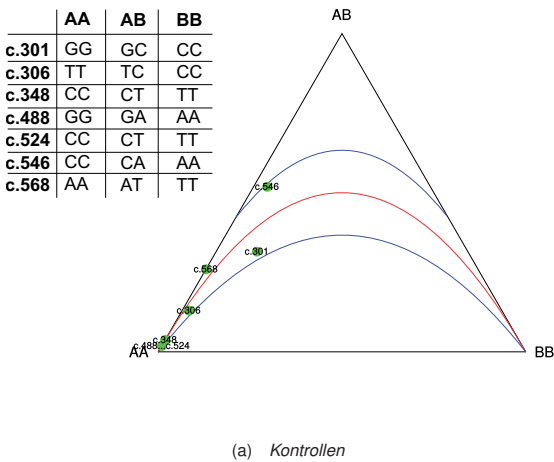


Abb. 22: **Blutsenkungsgeschwindigkeit nach zwei Stunden.** Die Blutsenkung nach zwei Stunden wird für die Kontrollgruppe und die Patientengruppe mittels Boxplot nach Tukey dargestellt; *: eindeutiger Unterschied (Wilcoxon rank-sum test, $p<0,05$)

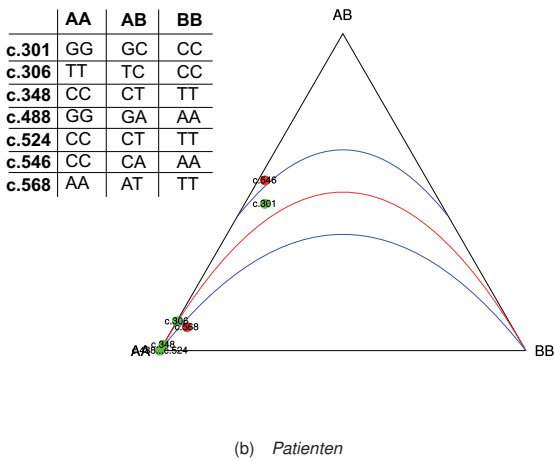
Tabelle 12: **Blutsenkungsgeschwindigkeit nach zwei Stunden**

	Mean	Sd	Min.	1. Quartil	Median	3. Quartil	Max.	Wilcoxon rank-sum test
Kontrollen	13,35	7,14	2	8	13,5	18	31	p<0,05
Patienten	19,24	13,27	3	10,25	18	23,75	70	

4.2 Ergebnisse der genetischen Untersuchungen



(a) Kontrollen



(b) Patienten

Abb. 23: Ternärer Plot des Hardy-Weinberg-Equilibriums (HWE) für biallelische SNPs - Die jeweils rote Parabel zeigt die Ideallinie des HWE. Der Bereich zwischen den beiden jeweils blauen Parabeln stellt Abweichungen vom HWE von bis zu 5% dar (gemessen mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson). Die grün markierten SNPs befinden sich somit innerhalb und die rot markierten somit außerhalb des HWE. Links im Bild sind die Allele der unterschiedlichen SNPs aufgelistet, die den Punkten AA, AB und BB im ternären Plot entsprechen.

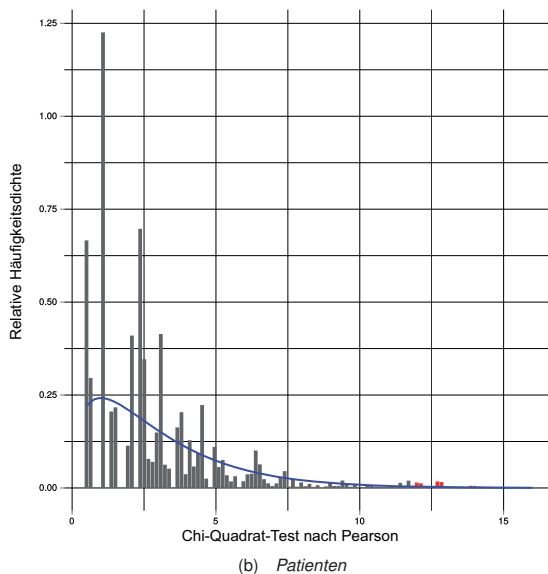
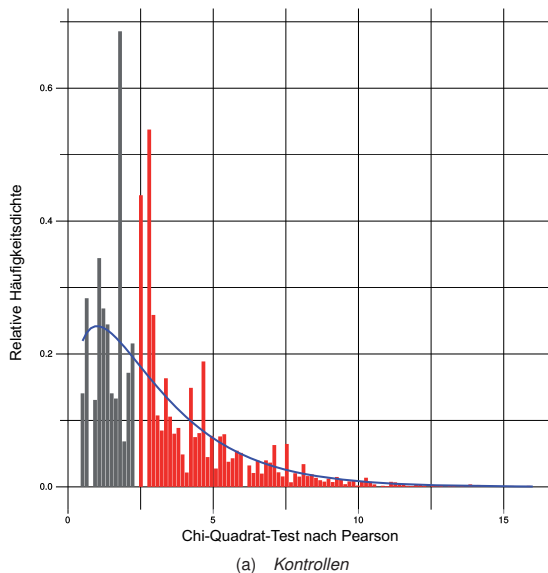


Abb. 24: **Histogramm der Häufigkeitsverteilung der Allele des SNPs c.576T>C>G** - Die Histogramme zeigen die tatsächliche Häufigkeitsverteilung der Allele des SNPs c.576T>C>G in Relation zu der zu erwartenden Häufigkeit, die durch den Chi-Quadrat-Test nach Pearson ermittelt wurde. Die asymptotische Verteilungskurve ist in blau dargestellt. Die grauen Balken sind die Ergebnisse, die der Nullverteilung besser entsprechen als die beobachteten Werte. Die roten Balken sind die Ergebnisse, die zumindest genau so weit von der Nullverteilung abweichen wie die beobachteten Werte. Somit stellt die rote Fläche den P-Wert dar.

Tabelle 13: Tests auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium in der Kontrollgruppe

SNP	Pearson's χ^2 -Test	Likelihood Ratio (LLR)	Fisher's Exakter Test
c.301G>C	p = 0,144447	p = 0,154758	p = 0,165267
c.306T>C	p = 0,265535	p = 0,337479	p = 0,303884
c.348C>T	p = 0,889726	p = 0,845970	p = 1,000000
c.488G>A	p = 0,945247	p = 0,922985	p = 1,000000
c.524C>T	p = 0,945247	p = 0,922985	p = 1,000000
c.546C>A	p = 0,073652	p = 0,059263	p = 0,107755
c.568A>T	p = 0,273756	p = 0,147986	p = 0,577723
576T>C>G	p = 0,500538	p = 0,392344	/

Tabelle 14: Tests auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium in der Patientengruppe

SNP	Pearson's χ^2 -Test	Likelihood-Ratio-Test(LLR)	Fisher's Exakter Test
c.301G>C	p = 0,335255	p = 0,323200	p = 0,508269
c.306T>C	p = 0,721300	p = 0,622181	p = 1,000000
c.348C>T	p = 0,945247	p = 0,922985	p = 1,000000
c.488G>A	p = 1,000000	p = 1,000000	p = 1,000000
c.524C>T	p = 1,000000	p = 1,000000	p = 1,000000
c.546C>A	p = 0,021819	p = 0,011911	p = 0,041417
c.568A>T	p = 0,000724	p = 0,012935	p = 0,017968
576T>C>G	p = 0,016145	p = 0,056444	/

Die Sequenzanalyse des *FPR1*-Gens von Base 250 bis Base 615 wurde bei allen 108 Studienteilnehmern durchgeführt. In der Kontroll- und der Patientengruppe befanden sich jeweils 54 Individuen. Insgesamt konnten acht SNPs identifiziert werden. In der Kontrollgruppe befanden sich alle SNPs im Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE). In der Patientengruppe waren nur die SNPs c.301G>C, c.306T>C, c.348C>T, c.488G>A, c.524C>T im HWE. Die SNPs c.546C>A, c.568A>T und 576T>C>G befanden sich nicht im HWE. Die Grafische Darstellung der Ergebnisse zeigten die Abbildungen 23 und 24. Die p-Werte für den Chi-Quadrat-Test nach Pearson, den Likelihood-Ratio-Test und Fishers Exakten Test sind in den Tabellen 13 und 14 zusammengefasst.

4.2.1 Allelfrequenzen der *FPR1*-SNPs

4.2.1.1 Synonyme SNPs

Die SNPs c.306T>C/p.F102F, c.348C>T/p.I116I und c.546C>A/p.P182P sind synonym, d.h. die jeweils möglichen Basen kodieren für dieselbe Aminosäure im Protein.

Das c.306T-Allel trat sowohl in der Patientengruppe (95,37 %) als auch in der Kontrollgruppe (91,67 %) weitaus häufiger auf als das c.306C-Allel (4,63 % bzw. 8,33 %).

Das c.348T-Allel konnte nur bei einem Patienten (1,85 %) und bei zwei Kontrollen (3,70 %) festgestellt werden.

Das c.546C-Allel kam in der Patientengruppe mit einer Häufigkeit von 71,30 % und in der Kontrollgruppe mit einer Häufigkeit von 70,37 % vor. Entsprechend war das c.546A-Allel zu 28,70 % in der Patienten- und zu 29,63 % in der Kontrollgruppe vertreten.

Mögliche Assoziationen der SNPs mit einer der beiden Gruppen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test überprüft. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Tabellen 15, 16 und 17).

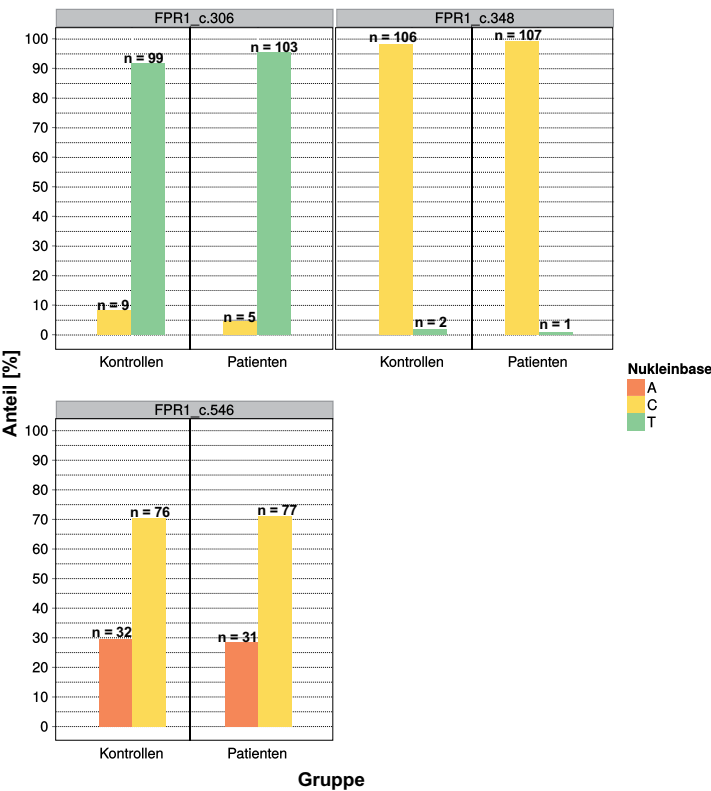


Abb. 25: **Allelfrequenzen synonymer SNPs** - Die Häufigkeit bestimmter Allele an den Basenpositionen 306, 348 und 546 wird für die beiden Gruppen anhand von Säulendiagrammen prozentual dargestellt. Zusätzlich ist die Anzahl der jeweiligen Nukleinbase über den Säulen angegeben.

Tabelle 15: **FPR1_c.306**

	T	C	total	Pearson's X ² -Test
Kontrollen	99 (91,67%)	9 (8,33%)	108	p = 0,2690
Patienten	103 (95,37%)	5 (4,63%)	108	
total	202 (93,52%)	14 (6,48%)	216	

Tabelle 16: *FPR1_c.348*

	C	T	total	Pearson's χ^2 -Test
Kontrollen	106 (98,15%)	2 (1,85%)	108	p = 0,561
Patienten	107 (99,07%)	1 (0,93%)	108	
total	213 (98,61%)	3 (1,39%)	216	

Tabelle 17: *FPR1_c.546*

	C	A	total	Pearson's χ^2 -Test
Kontrollen	76 (70,37%)	32 (29,63%)	108	p = 0,881
Patienten	77 (71,30%)	31 (28,70%)	108	
total	153 (70,83%)	63 (29,17%)	216	

4.2.1.2 Nicht-synonyme SNPs

Die SNPs c.301G>C/p.V101L, c.488G>A/p.R163H, c.524C>T/p.A175V, c.568A>T/p.R190W und c.576T>C>G/p.N192K sind nicht-synonym, d.h. der jeweilige Basenaustausch resultiert in einer Veränderung der Aminosäuresequenz im Protein.

Das c.301G-Allel trat in der Patientengruppe zu 71,30 % und das c.301C-Allel entsprechend zu 28,70 % auf. Die Relation in der Kontrollgruppe war vergleichbar ($p = 0,7613$).

Sowohl das c.488A-Allel als auch das c.524T-Allel kamen jeweils nur in der Kontrollgruppe mit einer Häufigkeit von 0,93 % vor. Die Assoziation dieser Mutationen mit der Kontrollgruppe war statistisch nicht signifikant ($p = 0,3162$).

Das c.568A-Allel kam in der Patientengruppe zu 92,59 % und in der Kontrollgruppe zu 87,04 % vor. Entsprechend war das c.568T-Allel zu 7,41 % in der Patienten- und zu 12,96 % in der Kontrollgruppe vorhanden. Es konnten keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt werden ($p = 0,1771$).

An der Position 576 des *FPR1*-Gens kam bei den Patienten Thymin zu 48,15 %, Guanin zu 44,44 % und Cytosin zu 7,41 % vor. In der Kontrollgruppe war an Position 576 Thymin zu 55,56 %, Guanin zu 31,48 % und Cytosin zu 12,96 % vorhanden. Mit Fishers exaktem Test konnte kein Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden ($p = 0,1004$).

Tabelle 18: *FPR1_c.301*

	G	C	total	Pearson's χ^2 -Test
Kontrollen	79 (73,15%)	29 (26,85%)	108	p = 0,7613
Patienten	77 (71,30%)	31 (28,70%)	108	
total	156 (72,22%)	60 (27,78%)	216	

Tabelle 19: *FPR1_c.488*

	G	A	total	Pearson's χ^2 -Test
Kontrollen	107 (99,07%)	1 (0,93%)	108	p = 0,3162
Patienten	108 (100,00%)	0 (0,00%)	108	
total	215 (99,54%)	1 (0,46%)	216	

Tabelle 20: *FPR1_c.524*

	C	T	total	Pearson's χ^2 -Test
Kontrollen	107 (99,07%)	1 (0,93%)	108	p = 0,3162
Patienten	108 (100,00%)	0 (0,00%)	108	
total	215 (99,54%)	1 (0,46%)	216	

Tabelle 21: *FPR1_c.568*

	A	T	total	Pearson's χ^2 -Test
Kontrollen	94 (87,04%)	14 (12,96%)	108	p = 0,1771
Patienten	100 (92,59%)	8 (7,41%)	108	
total	194 (89,81%)	22 (10,19%)	216	

Tabelle 22: *FPR1_c.576*

	T	C	G	total	Pearson's χ^2 -Test
Kontrollen	60 (55,56%)	14 (12,96%)	34 (31,48%)	108	p = 0,1004
Patienten	52 (48,15%)	8 (7,41%)	48 (44,44%)	108	
total	112 (51,85%)	22 (10,19%)	82 (37,96%)	216	

4.2.2 Allelassoziationen der *FPR1*-SNPs

4.2.2.1 Synonyme SNPs

In der Patientengruppe waren 90,74 % der Individuen homozygot für das c.306T-Allel. Die übrigen 9,26 % wiesen den heterozygoten Genotyp c.306T/C auf. In der Kontrollgruppe lag der homozygote Genotyp c.306T/T bei 85,19 % bzw. der homozygote Genotyp c.306C/C bei 0,93 % der Individuen vor. Der T/C-Genotyp war bei 12,96 % der Individuen vorhanden. Es konnte kein Hinweis auf Assoziation festgestellt werden ($p = 0,5558$).

98,15 % der Patienten und 96,30 % der Kontrollen hatten den homozygoten Genotyp c.348T/T. Die übrigen Individuen wiesen den heterozygoten Genotyp c.348C/T auf. Die Allelverteilung war in beiden Gruppen vergleichbar ($p = 0,9999$).

Der homozygote Genotyp c.546C/C kam in der Patientengruppe und in der Kontrollgruppe zu jeweils 44,4 % vor. Nur 1,85 % der Patienten und 3,70 % der Kontrollen waren

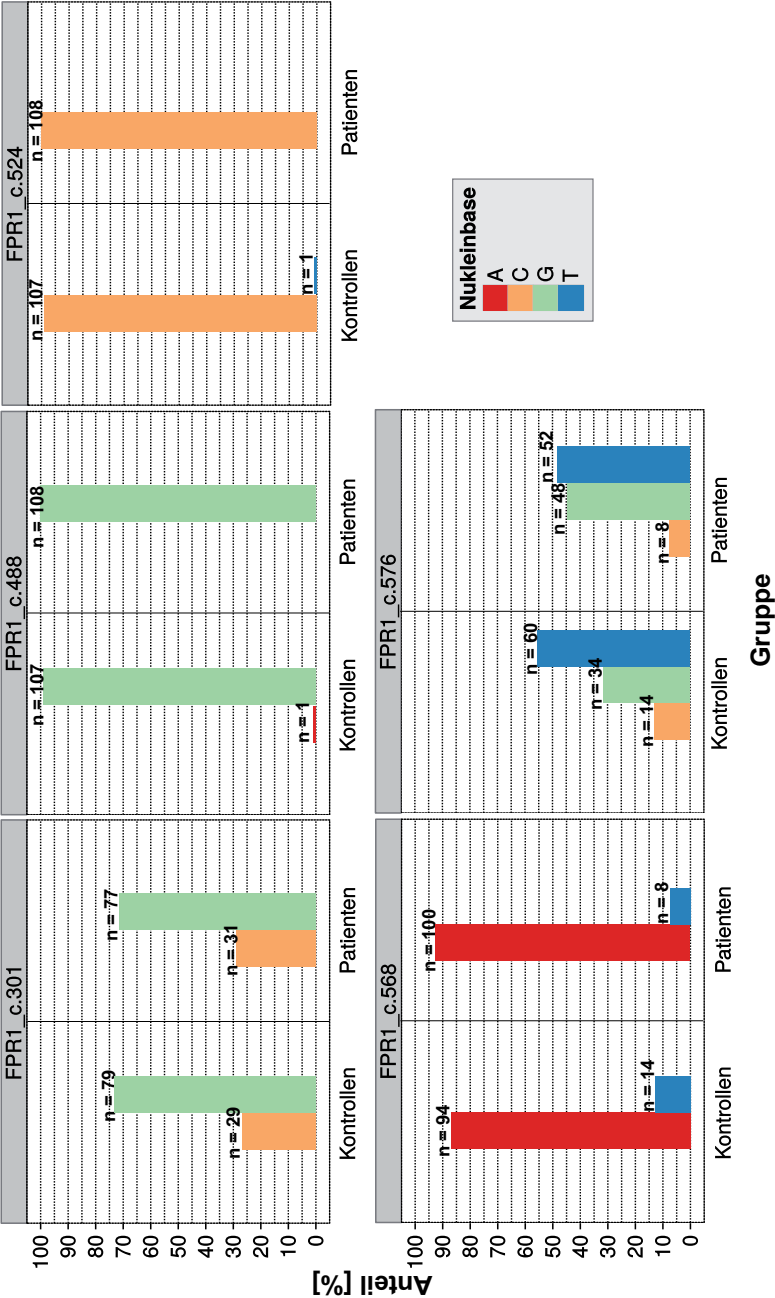


Abb. 26: **Allelfrequenzen nicht-synonymer SNPs** - Die Häufigkeit bestimmter Allele an den Basenpositionen 301, 488, 524, 568 und 576 wird für die beiden Gruppen anhand von Säulendiagrammen prozentual dargestellt. Zusätzlich ist die Anzahl der jeweiligen Nukleinbase über den Säulen angegeben.

homozygot für das c.546A-Allel. Den heterozygoten C/A-Genotyp hatten 53,70 % der Patienten und 51,85 % der Kontrollen. Mit Fishers exaktem Test konnte kein Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden ($p > 0,9999$).

Tabelle 23: **c.306T>C / p.F102F**

	TT	TC	CC	total	Fisher's Exakter Test
Kontrollen	46 (85,19)	7 (12,96%)	1 (1,85%)	54	$p = 0,5558$
Patienten	49 (90,74%)	5 (9,26%)	0 (0,00%)	54	
total	95 (87,96%)	12 (11,11%)	1 (0,93%)	108	

Tabelle 24: **c.348C>T / p.I116I**

	CC	CT	TT	total	Fisher's Exakter Test
Kontrollen	52 (96,30%)	2 (3,70%)	0 (0,00%)	54	$p > 0,9999$
Patienten	53 (98,15%)	1 (1,85%)	0 (0,00%)	54	
total	105 (97,22%)	3 (2,78%)	0 (0,00%)	108	

Tabelle 25: **c.546C>A / p.A182A**

	CC	CA	AA	total	Fisher's Exakter Test
Kontrollen	24 (44,44%)	28 (51,85%)	2 (3,70%)	54	$p > 0,9999$
Patienten	24 (44,44%)	29 (53,70%)	1 (1,85%)	54	
total	48 (44,44%)	57 (52,78%)	3 (2,78%)	108	

4.2.2.2 Nicht-synonyme SNPs

Die heterozygoten Genotypen c.488G/A und 524C/T wurden jeweils nur einmal und zwar bei zwei unterschiedlichen Individuen aus der Kontrollgruppe nachgewiesen. Das c.488A-Allel würde auf der Proteinbene zum Einbau von Histidin anstelle von Arginin führen, während das c.524T-Allel zum Einbau von Valin anstelle von Alanin führen würde. Es scheint kein Zusammenhang zwischen diesen beiden Allelen und dem Krankheitsbild der AP zu bestehen ($p > 0,9999$).

Die Häufigkeit des heterozygoten Genotyps c.301G/C belief sich in der Patientengruppe auf 46,30 % und in der Kontrollgruppe auf 31,48 %. Dementsprechend kommt es an der Proteinposition 101 entweder zum Einbau der Aminosäuren Valin oder Leucin. 48,15 % der Patienten und 57,41 % der Kontrollen waren homozygot für das c.301G-Allel. Für das c.301C-Allel waren 5,56 % der Patienten und 8,33 % der Kontrollen homozygot. Die Unterschiede in beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant ($p = 0,288$).

Der homozygote Genotyp c.568A/A kam mit 88,89 % bei den Patienten häufiger vor als bei den Kontrollen mit 74,07 %. Nur zwei Individuen, die beide zur Patientengruppe gehörten, waren homozygot für das c.568T-Allel. Bei ihnen ist somit Tryptophan an der Proteinposition 190 anstelle von Arginin vorhanden. Insgesamt 25,93 % der Kontrollen hatten den heterozygoten Genotyp c.568A/T. In der Patientengruppe waren es 7,41 %.

Die Unterschiede in der Genotypverteilung in beiden Gruppen waren statistisch eindeutig ($p = 0,00109$).

An der Genposition c.576 konnten sechs verschiedene Genotypen identifiziert werden. Der homozygote c.576T/T-Genotyp kam in der Patientengruppe zu 24,07 % und in der Kontrollgruppe zu 31,48 % vor. 3,70 % der Patienten waren homozygot für das c.576C-Allel. Bei 5,56 % der Patienten und bei 18,52 % der Kontrollen wurde der heterozygote c.576T/C-Genotyp festgestellt. Der heterozygote c.576C/G-Genotyp lag bei 1,85 % der Patienten und bei 7,41 % der Kontrollen vor. Sowohl das c.576T-Allel als auch das 576C-Allel führen an der Proteinposition 192 zum Einbau von polarem Asparagin. Das c.576G-Allel hingegen führt zum Einbau von basischem Lysin. 22,22 % der Patienten und 12,96 % der Kontrollen waren für das c.576G-Allel homozygot. Es zeigte sich ein tendentieller Unterschied der Genotypverteilung zwischen beiden Gruppen ($p = 0,056$). Jedoch waren die Unterschiede in Bezug auf die kodierte Aminosäure nicht eindeutig ($p = 0,1742$). In der Patientengruppe wurde zu 33,33 % für Asparagin, zu 44,44 % für Asparagin/Lysin und zu 22,22 % für Lysin kodiert. In der Kontrollgruppe waren es 50 % für Asparagin, 37,04 % für Asparagin/Lysin und 17,59 % für Lysin.

Tabelle 26: **c.301G>C / p.V101L**

	Val	Val/Leu	Leu	total
Kontrollen	31 (57,41%)	17 (31,48%)	6 (11,11%)	54
Patienten	26 (48,15%)	25 (46,30%)	3 (5,56%)	54
total	57 (57,78%)	42 (38,89%)	9 (8,33%)	108
Fisher's Exakter Test	$p > 0,288$			

Tabelle 27: **c.488G>A / p.R163H**

	Arg	Arg/His	His	total
Kontrollen	53 (98,15%)	1 (1,85%)	0 (0,00%)	54
Patienten	54 (100,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	54
total	107 (99,07%)	1 (0,93%)	0 (0,00%)	108
Fisher's Exakter Test	$p > 0,9999$			

Tabelle 28: **c.524C>T / p.A175V**

	Ala	Ala/Val	Val	total
Kontrollen	53 (98,15%)	1 (1,85%)	0 (0,00%)	54
Patienten	54 (100,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	54
total	107 (99,07%)	1 (0,93%)	0 (0,00%)	108
Fisher's Exakter Test	$p > 0,9999$			

Tabelle 29: **c.568A>T / p.R190W**

	Arg	Arg/Trp	Trp	total
Kontrollen	40 (74,07%)	14 (25,93%)	0 (0,00%)	54
Patienten	48 (88,89%)	4 (7,41%)	2 (3,70%)	54
total	88 (81,48%)	18 (16,67%)	2 (1,85%)	108
Fisher's Exakter Test	$p = 0,0109$			

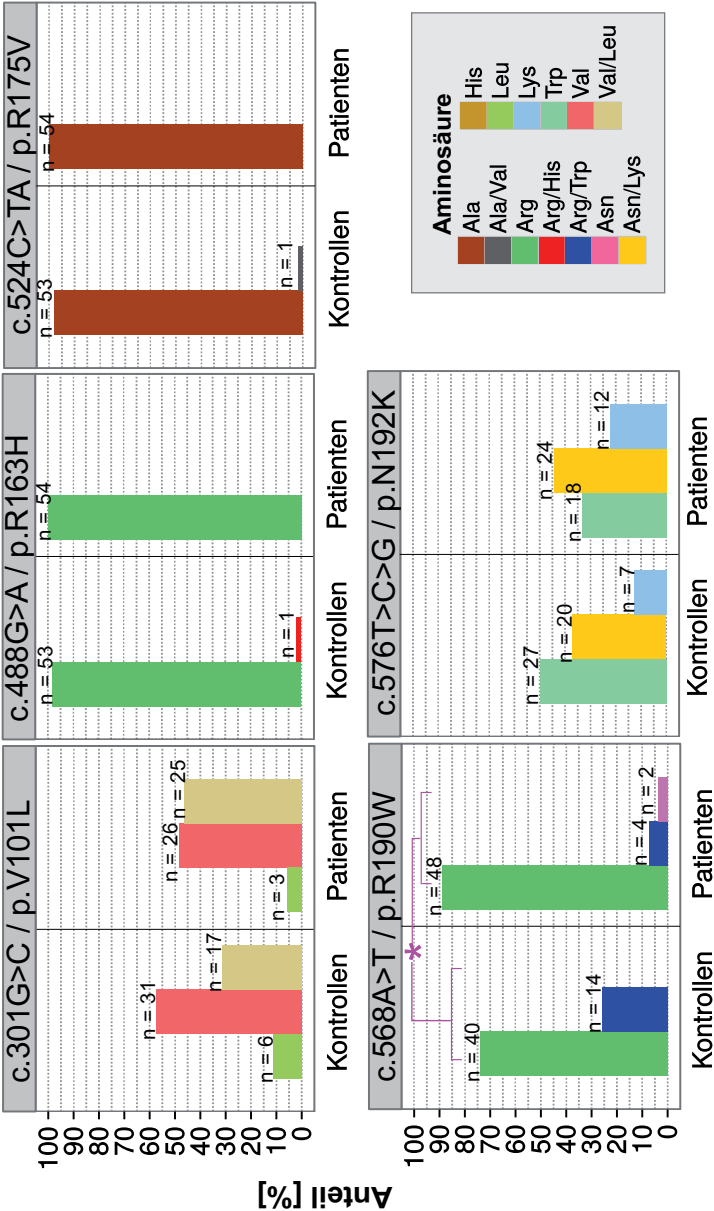


Abb. 27: **Allelassoziationen nicht-synonymer SNPs** - Die Häufigkeit bestimmter Aminosäuren an den Proteinpositionen 101, 163, 175, 190 und 192 wird für die beiden Gruppen anhand von Säulendiagrammen prozentual dargestellt. Zusätzlich ist die Anzahl der jeweiligen Aminosäure über den Säulen angegeben; *: eindeutiger Unterschied (Fisher's Exakter Test, $p < 0,05$)

Tabelle 30: **c.576T>C>G / p.N192K**

	TT	TC	CC	TG	CG	GG	total
Kontrollen	17 (31,48%)	10 (18,52%)	0 (0,00%)	16 (29,63%)	4 (7,41%)	7 (12,96%)	54
Patienten	13 (24,07%)	3 (5,56%)	2 (3,70%)	23 (42,59%)	1 (1,85%)	12 (22,22%)	54
total	30 (27,78%)	13 (12,04%)	2 (1,85%)	39 (36,11%)	5 (4,63%)	19 (17,59%)	108
Fisher's	p = 0,056						
Exakter Test							

Tabelle 31: **c.576T>C>G / p.N192K**

	Asn	Asn/Lys	Lys	total
Kontrollen	27 (50,00%)	20 (37,04%)	7 (12,96%)	54
Patienten	18 (33,33%)	24 (44,44%)	12 (22,22%)	54
total	45 (41,67%)	44 (40,74%)	19 (17,56%)	108
Fisher's Exakter Test	p = 0,1742			

4.2.3 Haplotypen-Analyse

Zur Haplotypen-Analyse wurden die nicht-synonymen SNPs herangezogen. Die SNPs 488G>A und 524C>T, die bei Individuen der Kontrollgruppe nachgewiesen werden konnten, wurden nicht in die Analyse einbezogen, da auf Grund der geringen Frequenz eine Assoziation mit der aggressiven Parodontitis ausgeschlossen werden kann.

Die Zwei-Marker-Analysen wurden für die Haplotypenkombinationen c.301/c.568, c.301/c.576 und c.568/c.576 durchgeführt. Die Odds Ratio lag für die Haplotypenkombinationen c.301/c.568 zwischen 0,58 und 1,13, für c.301/576 zwischen 0,54 und 2,05 und für c.568/c.576 zwischen 0,58 und 1,74. Die globalen p-Werte für die Zwei-Marker-Haplotypen-Analyse waren statistisch nicht signifikant (Tabellen 32, 33 und 34). Das c.568T-Allel und das c.576C-Allel waren bei allen Individuen miteinander assoziiert, so dass ein Kopplungsungleichgewicht zwischen diesen beiden Loci vorliegt.

Die Drei-Marker-Analysen wurden für die Haplotypenkombinationen c.301/c.568/c.576 durchgeführt. Die Odds Ratio für die Haplotypenkombinationen lag zwischen 0,58 und 2,05. Der globale p-Wert betrug 0,2977. Eine Assoziation mit dem Krankheitsbild besteht somit nicht.

Tabelle 32: **Zwei-Marker-Haplotypen-Analyse c.301/c.568**

	Kontrollen	Patienten	Odds Ratio	95% CI
301C/568A	29 (26,90%)	31 (28,70%)	1,1	0,60 - 1,99
301G/568A	66 (61,10%)	69 (63,90%)	1,13	0,65 - 1,95
301G/568T	13 (12,00%)	8 (7,40%)	0,58	0,23 - 1,47
Pearson's X²-Test	p = 0,5743			

Tabelle 33: **Zwei-Marker-Haplotypen-Analyse c.301/c.576**

	Kontrollen	Patienten	Odds Ratio	95% CI
301C/576G	2,7 (2,50%)	5,3 (4,90%)	2,05	0,46 - 9,19
301G/576T	33,7 (31,20%)	26,3 (24,40%)	0,71	0,39 - 1,29
301G/576G	31,3 (29,00%)	42,7 (39,50%)	1,6	0,91 - 2,82
301C/576T	26,3 (24,40%)	25,7 (23,80%)	0,97	0,52 - 1,81
301G/576C	14 (13,00%)	8,0 (7,40%)	0,54	0,22 - 1,34
Pearson's χ^2-Test			p = 0,2501	

Tabelle 34: **Zwei-Marker-Haplotypen-Analyse c.568/c.576**

	Kontrollen	Patienten	Odds Ratio	95% CI
568A/576G	34 (31,50%)	48 (44,40%)	1,74	1,00 - 3,04
568A/576T	59 (54,60%)	52 (48,10%)	0,74	0,43 - 1,27
568T/576C	13 (12,00%)	8 (7,40%)	0,58	0,23 - 1,47
568A/576C	1 (0,90%)	0 (0,00%)		
Pearson's χ^2-Test			p = 0,1621	

Tabelle 35: **Drei-Marker-Haplotypen-Analyse c.301/c.568/c.576**

	Kontrollen	Patienten	Odds Ratio	95% CI
301C/568A/576G	2,7 (2,50%)	5,3 (4,90%)	2,05	0,46 - 9,15
301G/568A/576T	33,7 (31,2%)	26,3 (24,40%)	0,71	0,39 - 1,3
301G/568A/576G	31,3 (29,00%)	42,7 (39,50%)	1,6	0,91 - 2,82
301C/568A/576T	26,3 (24,40%)	25,7 (23,80%)	0,97	0,52 - 1,8
301G/568T/576C	13 (12,00%)	8,0 (7,40%)	0,58	0,23 - 1,47
301G/568A/576C	1 (0,90%)	0 (0,00%)		
Pearson's χ^2-Test			p = 0,2977	

5 Diskussion

Über die Ätiologie der aggressiven Parodontitis ist bis heute wenig bekannt (SMITH *et al.*, 2010). Es bestehen jedoch Hinweise darauf, dass PMN bei Patienten mit aggressiver Parodontitis abnorme Zellfunktionen aufweisen und so die Wirtsanfälligkeit für parodontale Erkrankungen begünstigen.

In klassischen Studien aus den 70er und 80er Jahren wurde beschrieben, dass die Abwehrfunktion der PMN bei den Erkrankten vermindert ist und darin der Ausbruch der aggressiven Parodontitis und die rasche parodontale Destruktion begründet liegen (CIANCIOLA *et al.*, 1977; PAGE *et al.*, 1985; VAN DYKE *et al.*, 1980, 1982). Reduzierte PMN-Chemotaxis wurde als Marker für aggressive Parodontitis bei Vererbungsstudien diskutiert (VAN DYKE *et al.*, 1985). Neuere Untersuchungen, bei denen PMN von Patienten mit aggressiver Parodontitis mit fMLP stimuliert wurden, zeigen, dass nicht prinzipiell alle Abwehrfunktionen der Zellen reduziert sein müssen. In diesen Studien stellte sich heraus, dass destrukturierenden PMN-Funktionen im Vergleich zu parodontal gesunden Kontrollen deutlich erhöht waren (BUCHMANN *et al.*, 2009; DIAS *et al.*, 2011; SHIBATA *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob bei deutschen Patienten mit aggressiver Parodontitis und bei deutschen parodontal gesunden Kontrollen Mutationen an den Positionen 301, 306, 329, 348, 378, 546, 568 oder 576 des *FPR1*-Gens vorkommen und ob Assoziationen dieser Mutationen mit einer der beiden Gruppen bestehen.

5.1 SNP-Analyse

In den Untersuchungen von GWINN *et al.* (GWINN *et al.*, 1999) konnten bei 29 von 30 Patienten Punktmutationen im *FPR1*-Gen nachgewiesen werden. Diese waren an den Genpositionen 329, 378 oder an beiden Genpositionen lokalisiert. *In-vitro*-Studien anderer Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass beide Mutationen zu einer potentiellen Störung der Rezeptorfunktion des FPR1 führen (JONES *et al.*, 2003; SEIFERT und WENZEL-SEIFERT, 2001). Trotz der Verwendung derselben Primer wie bei GWINN *et al.* (GWINN *et al.*, 1999) gelang es weder der Gruppe von ZHANG *et al.* (ZHANG *et al.*, 2003) noch uns, Veränderungen an den Genpositionen 329 oder 378 des *FPR1*-Gens bei Patienten oder Probanden nachzuweisen. Auch die übrigen Arbeitsgruppen (GUNJI *et al.*, 2007; MANEY *et al.*, 2009), die andere Primer verwendeten, konnten die Ergebnisse von GWINN *et al.* (GWINN *et al.*, 1999) nicht reproduzieren. Eine Analyse der von GWINN *et al.* (GWINN *et al.*, 1999) eingesetzten Primer FMLP 2F 5'-GGCCGTGGCTGACTTCTG-3' und 2R 5'-GGGCCACCACTGATATG-3' mittels Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) zeigt, dass diese spezifisch an eine Gensequenz im *FPR1*-Gen (NCBI Reference Sequence NM_001193306.1 und NM_002029.3) binden. Es ist somit auszuschließen, dass eine falsche Zielsequenz amplifiziert worden ist.

5.1.1 Synonyme SNPs

In unserer Untersuchung wurden synonyme SNPs an den Genpositionen 306, 348 und 546 entdeckt. Für keinen dieser SNPs konnte eine Assoziation mit der AP nachgewiesen werden. Auch die Gruppe von ZHANG *et al.* (ZHANG *et al.*, 2003), die Untersuchungen an Afro-Amerikanern, Brasilianern und Türken durchführte, und die Gruppe von MANEY *et al.* (MANEY *et al.*, 2009), die Afro-Amerikaner und Brasilianer untersuchte, konnten dieselben synonymen SNPs in den jeweiligen Populationen identifizieren.

ZHANG *et al.* (ZHANG *et al.*, 2003) konnten eine Assoziation des c.306C-Allels in der türkischen Population ($p = 0,0139$) und eine Assoziation des c.348T-Allels in der brasilianischen Population ($p = 0,0158$) mit der AP feststellen. Hinter dem gehäuften Vorkommen des c.348T-Allels in der Gruppe der Brasilianer vermuteten ZHANG *et al.* (ZHANG *et al.*, 2003) eine Reflektion der ethnischen Vielfalt in dieser Population. Die klinische Bedeutung dieser SNPs wurde nicht weiter hinterfragt, da sie nicht zu einem Aminosäureaustausch im Rezeptor führen.

In der Untersuchung von MANEY *et al.* (MANEY *et al.*, 2009) war die Verteilung der synonymen SNPs in der türkischen Population bei Patienten und Kontrollen vergleichbar. Hingegen wurde eine Assoziation des c.348T-Allels mit AP bei Afro-Amerikanern festgestellt ($p = 0,029$). Die Anzahl der untersuchten afro-amerikanischen Individuen war mit 30 Patienten und 33 Kontrollen relativ gering. Die Kontrollen wurden zusätzlich mit Daten von 55 Afro-Amerikanern aus dem HapMap-Projekt (NCBI, Reference SNP(refSNP) Cluster Report: rs5030879) gepoolt. Drei dieser 55 Individuen waren homozygot für das c.348T-Allel. Dies wurde von MANEY *et al.* (MANEY *et al.*, 2009) mit einer Prävalenz der AP bei Afro-Amerikanern von ca. 2 % gedeutet (MELVIN *et al.*, 1991; FINE *et al.*, 2007). Die Assoziation des c.348T-Allels mit der Erkrankung war im Vergleich mit den gepoolten Probanden hoch-signifikant ($p = 0,0007$). Diese Methode des Poolens ist kritisch zu betrachten, da keine klinischen Daten von den HapMap-Individuen vorliegen. Somit gibt es auch keine Informationen über den Parodontalzustand dieser Population. Poolt man die afro-amerikanischen Patienten und Kontrollen aus der Studie von MANEY *et al.* (MANEY und WALTERS, 2009) mit denen aus der Studie von ZHANG *et al.* (ZHANG *et al.*, 2003), lässt sich keine Assoziation der Erkrankung mit dem c.348T-Allel herstellen ($p = 0,602$).

Nach Meinung von MANEY *et al.* (MANEY *et al.*, 2009) könnte der SNP c.348C>T Einfluss auf die Rezeptorexpression besitzen, weil die freie Energie der Sekundärstruktur der mRNA beim 348T.568A-Haplotyp höher ist als beim 348C.568A-Haplotyp. Bei einer höheren freien Energie könnte die Effizienz der mRNA-Translation auf Grund ihrer geringeren Stabilität reduziert sein. Für diese Herleitung gibt es bisher keine Evidenz. Bei Prokaryoten konnte gezeigt werden, dass die Sekundärstruktur der mRNA um den *region downstream* die Translationseffizienz beeinflusst (SEO *et al.*, 2009). Dieser Zusammenhang ist jedoch ein anderer als der von MANEY *et al.* (MANEY *et al.*, 2009) beschriebene. Für Eukaryoten sind derartige Zusammenhänge ebenso wenig bekannt (SHIBATA *et al.*, 2001).

In einer weiteren Studie konnten MANEY *et al.* (MANEY und WALTERS, 2009) eine Verminderung der PMN-Chemotaxis bei afro-amerikanischen Patienten mit AP, die den 348T/T-Genotyp hatten, um 34 % im Vergleich zu den Probanden nachweisen. Aber

auch bei den Patienten mit dem 348C/C-Genotyp wurde eine Verringerung der PMN-Chemotaxis um 20 % festgestellt. Die *FPR1*-Expression war nur bei den Patienten mit dem 348T/C-Genotyp reduziert, jedoch nicht bei denen mit dem 348T/T-Genotyp.

In der Untersuchung von GUNJI *et al.* (GUNJI *et al.*, 2007) an 49 japanischen Patienten mit AP und 373 Kontrollen konnte bei keinem der Studienteilnehmer eine Abweichung vom Wildtyp an der Genposition 348 beobachtet werden. Der SNP c.306T>C lag bei den Patienten und Probanden in vergleichbaren Relationen vor. Für das 546A-Allel konnte eine Assoziation mit AP bei Japanern festgestellt werden ($p = 0,045$). Eine funktionelle Konsequenz für den Rezeptor konnte jedoch nicht abgeleitet werden.

Für die SNPs c.306T>C, c.348C>T und c.546C>A konnte in keiner der aufgeführten Arbeiten ein Nachweis für ein Kopplungsungleichgewicht mit einem nicht-synonymen SNP erbracht oder ein Einfluss auf die Genregulation dargestellt werden. Es bestehen keine soliden Hinweise darauf, dass die identifizierten synonymen SNPs ein Erkrankungsrisiko für AP darstellen. Die Gegenüberstellung der von uns erhobenen mit den vorhandenen Daten deutet darauf hin, dass die Häufigkeit einzelner Allele in den unterschiedlichen Ethnien verschieden ist.

5.1.2 Nicht-synonyme SNPs

Nicht-synonyme SNPs wurden in dieser Studie an den Genpositionen 301, 488, 524, 568 und 576 entdeckt. Für keinen dieser SNPs konnte eine Assoziation mit der AP nachgewiesen werden. Es zeigte sich lediglich, dass der homozygote 568A/A-Genotyp in der Patientengruppe häufiger ausgeprägt war als bei den Kontrollen ($p = 0,00109$).

FPR1-26, FPR1-98 und FPR1-G6 sind die drei Isoformen des FPR1, die sich durch unterschiedliche Aminosäuren an den Positionen 101, 192 und 346 unterscheiden. Beim FPR1-26 (BOULAY *et al.*, 1990b) sind es p.V101 (c.301G), p.N192 (c.576T/C) und p.E346 (c.1037C), beim FPR1-98 (BOULAY *et al.*, 1990a) sind es p.L101 (c.301C), p.N192 (c.576T/C) und p.A346 (c.1037A) und beim FPR1-G6 (MURPHY *et al.*, 1993) sind es p.V101 (c.301G), p.K192 (c.576G) und p.A346 (c.1037A).

Der SNP c.301G>C führt zum Austausch von Valin gegen Leucin an der Proteinposition 101 in der dritten transmembranären Domäne des Rezeptors (Abb. 28b). Beide Aminosäuren sind unpolar und unterscheiden sich darin, dass Leucin eine um ein C-Atom längere aliphatische Seitenkette aufweist als Valin. Dies macht Leucin etwas größer als Valin (Abb. 28a). Die mögliche Konsequenz ist, dass es zu einer Störung der Kontakte mit anderen transmembranären Domänen oder mit der Lipidmembran kommen kann (Abb. 28c). Die Wahrscheinlichkeit, dass ein kompletter Proteindekt aus der Mutation entsteht, ist gering. BOULAY *et al.* (BOULAY *et al.*, 1990a) konnten bei ihrer Untersuchung keine Hinweise darauf finden, dass sich FPR1-R26 und FPR1-R98 in ihren Eigenschaften bezüglich Zelloberflächenlokalisation, Ligandenbindung und Endozytose unterscheiden.

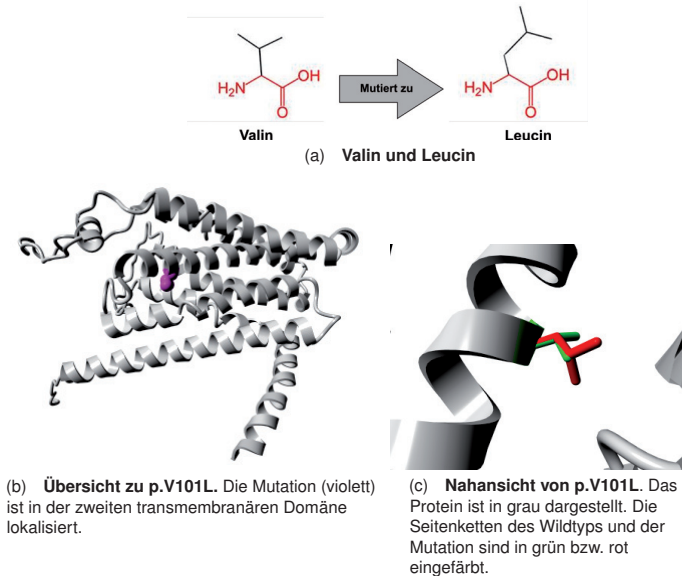


Abb. 28: SNP c.301G>C/p.V101L (VENSELAAR *et al.*, 2010)

ZHANG *et al.* (ZHANG *et al.*, 2003) und MANEY *et al.* (MANEY *et al.*, 2009) konnten in ihren Studien keine Assoziation des SNPs c.301G>C mit der AP in den unterschiedlichen Populationen feststellen. Hingegen stellten GUNJI *et al.* (GUNJI *et al.*, 2007) fest, dass der SNP c.301G>C mit AP bei Japanern assoziiert ist ($p = 0,029$). Nach der Meinung dieser Arbeitsgruppe könnten die Effekte der Mutation sein, dass die G-Protein-Kopplung oder auch die Ligandenbindung des FPR1 gestört werden.

Der SNP c.488G>A konnte nur bei einem heterozygoten Individuum aus der Kontrollgruppe beobachtet werden. Bei diesem SNP wird Arginin gegen Histidin an der Proteinposition 163 in der vierten transmembranären Domäne am Übergang zur zweiten extrazellulären Schleife des Rezeptors ausgetauscht (Abb. 29b). Beide Aminosäuren sind basisch. Die Restgruppe des Arginins ist aliphatisch während die des Histidins aromatisch ist (Abb. 29a). Außerdem ist die Restgruppe des Histidins vergleichsweise kleiner als beim Wildtyp. MIETTINEN *et al.* (MIETTINEN *et al.*, 1997) präparierten FPR1-Mutanten auf CHO-Zellen, um Bindungsstellen des Rezeptors zu identifizieren, die eine Rolle für die Ligandenbindungsaffinität spielen. Die Mutante p.A153F führte zur vollständigen und die Mutante p.W150A zur teilweisen intrazellulären Retention des Rezeptors. Die Mutante p.T157A wurde nicht retiniert, jedoch war die Bindung des Rezeptors an formylierte Peptide signifikant reduziert. Da die von uns gefundene Mutation p.R163H ebenso wie p.A153F, p.T157 und p.W150A in der vierten transmembranären Domäne lokalisiert ist, sind Einflüsse auf die Rezeptorexpression und die Ligandenbindungsaffinität des FPR1 möglich.

Der SNP c.488G>A wurde in keiner anderen Assoziationsstudien mit AP beschrieben (GUNJI *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2003; MANEY *et al.*, 2009), jedoch ist die Mutation in der SNP-Datenbank des NCBI aufgelistet (SNPid rs111768566). Eine klinische Assoziation ist nicht bekannt.

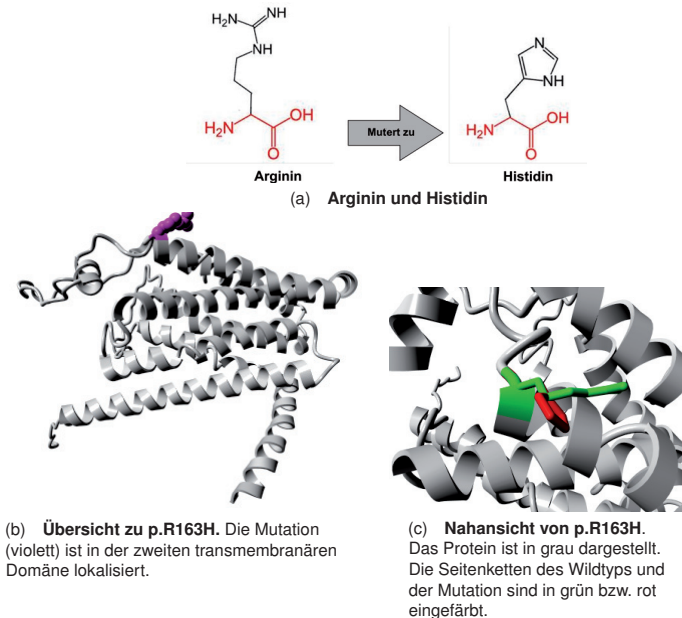


Abb. 29: **SNP c.488G>A/p.R163H** (VENSELAAR *et al.*, 2010)

Ebenso wie der SNP c.488G>A wurde der SNP c.524C>T nur bei einem einzigen heterozygoten Individuum aus der Kontrollgruppe nachgewiesen. Bei diesem SNP kommt es an der Proteinposition 175 zum Austausch von Alanin gegen Valin. Die Mutation ist somit in der zweiten extrazellulären Schleife des Rezeptors lokalisiert (Abb. 30b). Beide Aminosäuren sind unpolar, jedoch weist Valin in seiner Restgruppe zwei Methylgruppen mehr auf als das Alanin und ist daher größer (Abb. 30a). Diese Mutation wurde bisher von keiner anderen Forschungsgruppe beschrieben.

Zwischen Cys98 und Cys176 besteht eine Disulfidbrücke, die für den Formerhalt der Bindungstasche des FPR1 als entscheidend gilt (PEREZ *et al.*, 1994). Falls die zusätzlichen Methylgruppen von p.R175V die Ausbildung dieser Disulfidbrücke behindern würden, hätte dies mit hoher Wahrscheinlichkeit einen negativen Effekt auf die Ligandenbindung des Rezeptors. Die Kontrollperson wies jedoch keine Allgemeinerkrankungen auf, so dass es keine Hinweise auf eine reduzierte Immunität durch die Mutation gab.

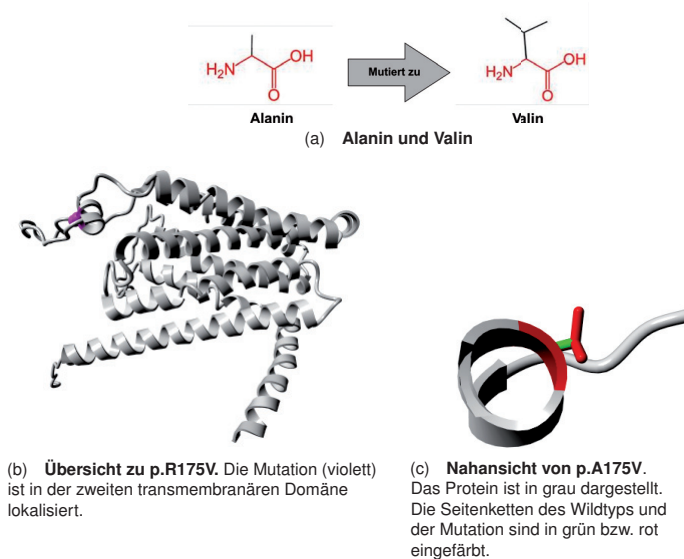
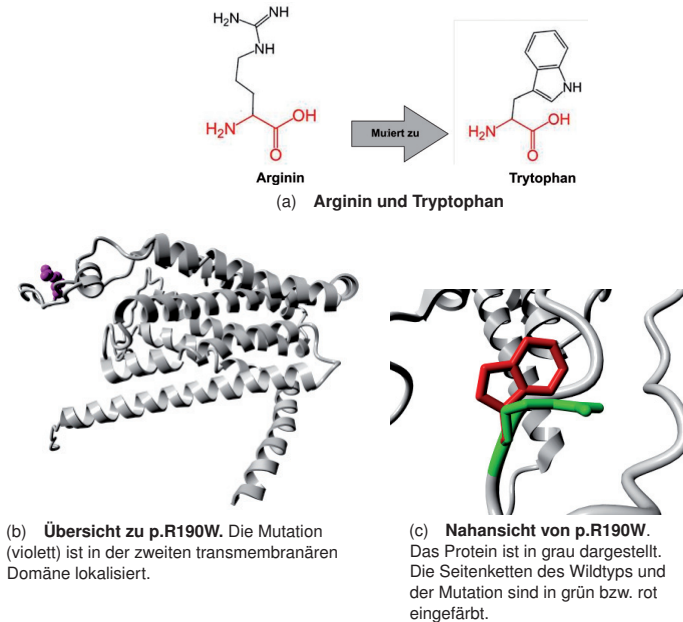


Abb. 30: **SNP c.524C>T/p.A175V** (VENSELAAR *et al.*, 2010)

Der SNP c.568A>T bewirkt den Einbau von Tryptophan anstelle von Arginin an der Proteinposition 190 in der zweiten externen Schleife des FPR1 (Abb. 31b). Während Arginin basisch ist, ist Tryptophan unpolar und weist ein aromatisches Indol-Ringsystem auf (Abb. 31a). Tryptophan ist zudem ein größeres Molekül als Arginin. Der Ladungs- und der Größenunterschied zwischen der Mutation und dem Wildtyp könnten dazu führen, dass sich das Protein nicht korrekt zusammenfalten kann oder dass Interaktionen mit Liganden oder anderen Anteilen des Rezeptors gestört werden (VENSELAAR *et al.*, 2010).

GUNJI *et al.* (GUNJI *et al.*, 2007) konnten in der untersuchten japanischen Population keinen signifikanten Unterschied für das Auftreten von c.568A>T bei Patienten mit der AP und den Kontrollen feststellen. MANEY *et al.* (MANEY *et al.*, 2009) konnten weder bei Türken noch bei Afro-Amerikanern eine Assoziation des SNPs mit AP feststellen. Bei der Untersuchung von ZHANG *et al.* (ZHANG *et al.*, 2003) hingegen wurde ein Bezug zwischen der AP und R190W bei Afro-Amerikanern festgestellt ($p = 0,0033$), nicht jedoch in den Gruppen der Türken oder Brasilianer ($p > 0,9999$).

Abb. 31: **SNP c.568A>T/p.R190W** (VENSELAAR *et al.*, 2010)

Der SNP c.576T>C>G führt dazu, dass anstelle der neutralen Aminosäure Asparagin die basische, positiv geladene Aminosäure Lysin an der Proteinposition 192 vorhanden ist (Abb. 32a). Die Mutation p.N192K betrifft somit ebenfalls die zweite extrazelluläre Schleife des FPR1 (Abb. 32b). Beide Aminosäuren sind hydrophil. Unterschiedlich ist jedoch, dass Lysin eine größere Seitenkette als Asparagin aufweist (Abb. 32c). Die positive Ladung des Lysins könnte bewirken, dass benachbarte Strukturen des Rezeptors sich voneinander entfernen (VENSELAAR *et al.*, 2010). Es ist wahrscheinlich, dass die Mutation die Ligandenbindungsspezifität und die Bindungsaffinität des Rezeptors verändert (ZHANG *et al.*, 2003). Ein Hinweis darauf ist, dass in der Wildtypform des niedrigaffinen FPR2 ebenfalls Lysin an der Proteinposition 192 vorhanden ist (Fu *et al.*, 2006).

In den Untersuchungen von MANEY *et al.* (MANEY *et al.*, 2009) und GUNJI *et al.* (GUNJI *et al.*, 2007) stellten sich keine Beziehungen zwischen AP und c.576T>C>G in den verschiedenen Ethnien heraus. Nur bei der afro-amerikanischen Population in der Studie von ZHANG *et al.* (ZHANG *et al.*, 2003) wurde eine Assoziation der Erkrankung mit dem SNP nachgewiesen ($p = 0,0018$).

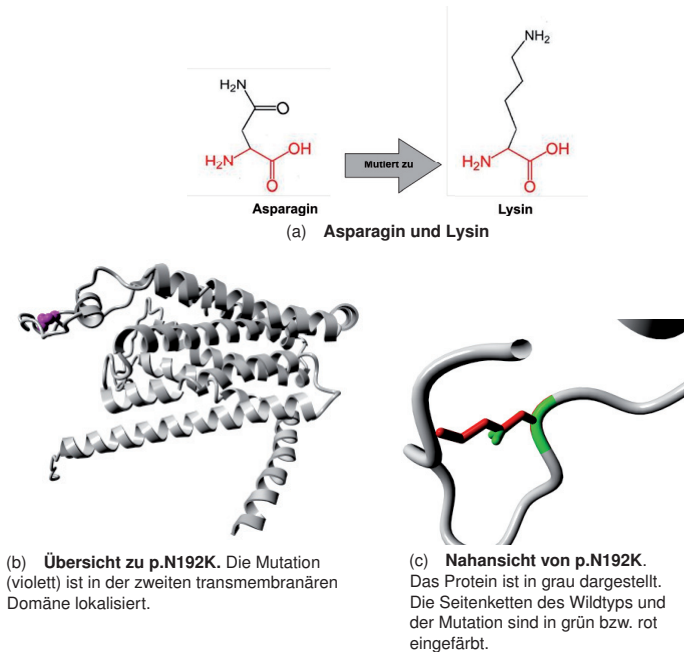


Abb. 32: **SNP c.576T>C>G/p.N192K** (VENSELAAR *et al.*, 2010)

5.1.3 Haplotypen-Analyse

Bei den unterschiedlichen Marker-Analysen in unserer Untersuchung ergaben sich keine Unterschiede zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe.

In der Untersuchung von GUNJI *et al.* (GUNJI *et al.*, 2007) war der Haplotyp -12915T/301G/546C bei Patienten mit AP signifikant überrepräsentiert ($p = 0,000020$). Die Haplotypen -12915C/301C/546C und -12915C/301G/546A kamen hingegen weitaus häufiger bei den Kontrollen vor ($p = 0,0064$ und $p = 0,00015$). Für den SNP c.576T>C>G bestand zwar kein Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p = 0,32$), jedoch trat der Haplotyp -12915T/576G in der Patienten-Gruppe markant häufiger auf ($p = 0,003$). Nach Ansicht der Untersucher ist es möglich, dass eine Assoziation des SNPs c.576T>C>G mit AP bei Japanern auf Grund der geringen Größe der Stichprobe nicht nachgewiesen werden konnte. Bei parodontal gesunden Individuen konnte die Arbeitsgruppe weiterhin aufzeigen, dass der -12915T-Genotyp mit einer geringeren mRNA-Expression des FPR1 in PMN einher geht.

Die Haplotypen-Analyse bei ZHANG *et al.* (ZHANG *et al.*, 2003) zeigte ein erhöhtes Auftreten des 568A/576G-Haplotyps bei Afro-Amerikanern mit AP ($p = 0,0002$). Bei Brasilianern und Türken gab es dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen.

Bei der Studie von MANEY et al. (MANEY *et al.*, 2009) zeigte sich bei der eine markante Häufung der Haplotypen 348T/568A, 348T/576T und 348T/568A/576T in der afro-amerikanischen Patienten-Gruppe ($p = 0,0036$, $p = 0,017$ und $p = 0,017$). Auf der anderen Seiten kamen die Haplotypen 348C/568A, 348C/576T und 348C/568A/576T signifikant häufiger in der Kontrollgruppe auf ($p = 0,041$, $p = 0,014$ und $p = 0,014$).

5.2 Kritische Beurteilung von Materialien und Methoden

In dieser Untersuchung wurden zwei Gruppen anhand klinischer Parameter entsprechend der aktuellen Klassifikation parodontaler Erkrankungen (LANG, 1999) gebildet.

Die Alters- und Geschlechterverteilung und die Anzahl von Zähnen war in beiden Gruppen vergleichbar.

Patienten mit AP wiesen im Durchschnitt höhere Sondierungstiefen und Attachment-level auf als die gesunden Kontrollen. Auch waren in der Patientengruppe Sondierungs- und Papillenblutungen häufiger. Hingegen war der durchschnittliche Plaque control record bei den gesunden Kontrollen höher als bei den Patienten. Alle klinischen Parameter unterschieden sich in beiden Gruppen signifikant. Die BSG war zwar nach zwei Stunden in der Patientengruppe höher als in der Kontrollgruppe, jedoch befanden sich die Werte für diesen Parameter in beiden Gruppen im Normbereich STUART (1993).

Die Arbeitsgruppe von ZHANG et al. (ZHANG *et al.*, 2003) machte keine Angaben zu den Ergebnissen der klinischen Untersuchung. Die Personenzahl in den Patienten- und Kontrollgruppen für Afro-Amerikaner, Brasilianer und Türken war mit 38/23, 25/52 und 48/40 im Vergleich zu der von uns durchgeführten Studie geringer. MANEY et al. (MANEY *et al.*, 2009) untersuchten lediglich 30 Afro-Amerikaner mit AP und 33 afro-amerikanische Kontrollen, jedoch waren es in der Gruppe der Türken 75/63. Die durchschnittliche ST und der durchschnittliche CAL lagen in der Gruppe der Afro-Amerikaner mit AP bei $3,70 \pm 0,20$ mm bzw. $2,98 \pm 0,27$ mm. Bei den türkischen Patienten mit AP waren es $3,67 \pm 0,11$ mm bzw. $4,21 \pm 0,14$ mm. Diese Werte sind mit denen in unserer Patientengruppe vergleichbar. GUNJI et al. (GUNJI *et al.*, 2007) untersuchten 49 japanische Patienten mit AP. Als parodontologischer Parameter wurde lediglich PPD mit $3,90 \pm 1,08$ mm in der Patientengruppe angegeben. Über die klinischen Daten der 373 ethnisch entsprechenden Kontrollen wurden keine Angaben gemacht.

Insgesamt waren die Probandenzahlen in den aufgeführten Studien sowie in der von uns durchgeführten relativ gering. Eine Erklärung dafür liegt sicherlich in der aufwendigen Diagnostik zur Beurteilung des parodontalen Zustandes. Hinzu kommt, dass die Prävalenz der AP gering ist. Die globale Prävalenz der AP nach den Kriterien der aktuellen Klassifikation parodontaler Erkrankungen (LANG, 1999) lässt sich anhand der bestehenden Literatur nicht sicher ableiten (DEMME und PAPAPANOU, 2010). Die Ergebnisse einer Längsschnittstudie zur Untersuchung der parodontalen Gesundheit in Vorpommern zeigen eine Prävalenz schwerer Parodontitis mit $CAL \geq 5$ mm von 1,6 % in der Gruppe der 20-29-Jährigen und von 9,9 % in der Gruppe der 30-39-Jährigen. An dieser Untersuchung nahmen 3557 Probanden teil (HOLTFRETER *et al.*, 2009). Zwischen chronischer und aggressiver Parodontitis wurde in der Studie nicht unterschieden, so dass die Prävalenz der AP in der

Population noch geringer sein dürfte. Dass in unserer Studie 54 Patienten mit AP rekrutiert werden konnten, ist somit als positiv zu bewerten. Um eine Population von einigen hundert Individuen mit AP zu untersuchen, wäre eine multizentrische Studie notwendig.

Zur Überprüfung des Hardy-Weinberg-Gesetzes wurde ein ternärer Plot (GRAFFELMAN und CAMARENA, 2008) angewendet. Echte Abweichungen vom HWE können aus nicht-zufälligen Paarungen, Selektion oder Migration entstehen. Jedoch ist das Ausmaß dieser echten Abweichungen bei den meisten Populationen gering (MINELLI *et al.*, 2008). Das HWE wird üblicherweise als Qualitätskontrolle bei genetischen Assoziationsstudien angewandt, um systematische Genotypisierungsfehler auszuschließen (WITTKE-THOMPSON *et al.*, 2005). Die Einhaltung des HWE wird dazu in der Kontrollgruppe getestet (ZIEGLER *et al.*, 2010). Die Verteilung aller identifizierten SNPs in der Kontrollgruppe dieser Studie entsprach dem HWE, so dass Genotypisierungsfehler ausgeschlossen werden können. Hingegen zeigte sich, dass sich die SNPs c.546C>A, c.568A>T und c.576T>C>G in der Patientengruppe nicht im HWE befanden. Abweichungen vom HWE in der Patientengruppe deuten nicht auf Genotypisierungsfehler hin, sondern auf mögliche Assoziationen zwischen Polymorphismus und Krankheitsbild (MINELLI *et al.*, 2008). Dieser Verdacht wurde durch weitere Analysen nur bei dem SNP c.568A>T bestätigt.

Durch Einbau falscher Nukleotide kann es bei jedem Amplifizierungszyklus zu Mutationen in der klonierten DNA kommen. Sowohl bei der PCR als auch der Sequenzierung wurde Taq-DNA-Polymerase eingesetzt. Für die Taq-DNA-Polymerase wird eine Fehlerrate von $<1 \times 10^{-5}$ bis 2×10^{-4} angegeben (ECKERT und KUNKEL, 1991). Dies bedeutet, dass pro Zyklus alle 5600 bis 83000 Basen ein falsches Nukleotid in der DNA-Kopie vorliegt. Zum Ausschluss falsch identifizierter SNPs wurden daher 5 DNA-Proben in der Kontrollgruppe und 5 DNA-Proben in der Patientengruppe doppelt amplifiziert und sequenziert. Zudem wurde die Sequenzierung in Sense- und Antisense-Richtung durchgeführt. Die DNA-Sequenzen der doppelt untersuchten Proben waren jeweils identisch.

Die Spezifität der verwendeten Primer wurde bereits unter Abschnitt 5.1 diskutiert.

5.3 Schlussfolgerung

Der Stichprobenumfang dieser Untersuchung ist mit denen internationaler Forschungsgruppe vergleichbar (GUNJI *et al.*, 2007; MANEY *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2003; GWINN *et al.*, 1999).

Durch die Untersuchungen dieser Forschungsgruppen konnten bisher neun SNPs im *FPR1*-Gen nachgewiesen werden. ZHANG *et al.* (ZHANG *et al.*, 2003) stellten eine Assoziation der SNPs c.568A>T und c.576T>C>G mit afroamerikanischen AP-Patienten fest. Bei Türken und Brasilianer mit AP lagen keine eindeutigen Unterschiede in der Allelverteilung im Vergleich zu den Kontrollgruppen vor. Bei GUNJI *et al.* (GUNJI *et al.*, 2007) wurden Assoziationen der SNPs -12915C>T, -10056T>C, -8430A>G, 301G>C und 546C>A mit AP bei japanischen Patienten nachgewiesen. In der Studie von MANEY *et al.* (MANEY *et al.*, 2009) bestand eine Assoziation zwischen dem 348T-Allel und einem erhöhten Risiko für AP in der Gruppe der Afroamerikaner. Bei türkischen Patienten mit AP konnten keine Assoziationen gezeigt werden. Die Ergebnisse von GWINN *et al.* (GWINN

et al., 1999) konnten in keiner der genannten Studie bestätigt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass über die unterschiedlichen Ethnien eine große Varianz von Assoziationen der AP mit bestimmten SNPs besteht. Die Ergebnisse der genannten Assoziationsstudien bekräftigen sich nicht gegenseitig und zeigen daher keine klaren Zusammenhänge mit dem Vorhandensein eines bestimmten Allels oder Haplotyps im *FPR1*-Gen und dem Auftreten der AP.

Die Strukturanalyse der abgeleiteten Isoformen des *FPR1* zeigten, dass funktionelle Konsequenzen am ehesten bei den SNPs c.568A>T und c.576T>C>G zu erwarten sind. Ausschließlich ZHANG *et al.* konnten eine Assoziation von c.568A>T und c.576T>C>G mit AP und zwar nur bei Afroamerikanern feststellen (ZHANG *et al.*, 2003). Da anzunehmen ist, dass sich die Ätiologie der AP in unterschiedlichen Ethnien nicht unterscheidet, ist davon auszugehen, dass selbst c.568A>T und c.576T>C>G nicht an der Entwicklung einer AP beteiligt sind.

In der vorliegenden Studie konnten sieben der bisher bekannten SNPs und noch ein weiterer bisher unbekannter SNP (c.524C>T) identifiziert werden. Nach kritischer Beurteilung wurden methodische Fehler ausgeschlossen, so dass die vorliegenden Ergebnisse als valide betrachtet werden können. Nach den daraus gewonnen Erkenntnissen scheint das Auftreten bestimmter Allele im *FPR1*-Gen nicht mit der AP in der untersuchten deutschen Population assoziiert zu sein. Die Nullhypothese wurde nicht widerlegt.

Da sich die Ergebnisse von GWINN *et al.* (GWINN *et al.*, 1999) in keiner der später erfolgten Studien reproduzieren ließen, muss die Richtigkeit der Resultate kritisch betrachtet werden.

6 Zusammenfassung

Es bestehen Hinweise darauf, dass PMN bei der Ätiologie der AP eine Rolle spielen (CIANCIOLA *et al.*, 1977; PAGE *et al.*, 1985; VAN DYKE *et al.*, 1980, 1982; BUCHMANN *et al.*, 2009). Bei genetischen Analysen des *FPR1*, einem Chemokinrezeptor auf PMN, in afro-amerikanischen, brasilianischen, japanischen, türkischen und kaukasischen Populationen wurden Mutationen des Rezeptors entdeckt, die mit der AP assoziiert waren (GWINN *et al.*, 1999; MANEY *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2003; GUNJI *et al.*, 2007).

In dieser Studie wurde erstmals untersucht, ob bei deutschen Patienten mit AP und bei deutschen parodontal gesunden Kontrollen Mutationen an den Positionen 301, 306, 329, 348, 378, 546, 568 oder 576 des *FPR1*-Gens vorkommen und ob Assoziationen dieser Mutationen mit einer der beiden Gruppen bestehen. Es konnten 54 Patienten mit AP und 54 parodontal gesunde Kontrollen rekrutiert werden. Bei einer vergleichbaren Alters- und Geschlechterverteilung sowie Anzahl von Zähnen in beiden Gruppen waren die klinischen Parameter ST, CAL, BOP, PLI und PBI signifikant unterschiedlich.

Bei den Patienten und Probanden wurde Blut entnommen und daraus anschließend DNA isoliert. Durch PCR wurde ein 584bp großes DNA-Fragment des *FPR1*-Gens amplifiziert und anschließend extern sequenziert. Durch die DNA-Sequenz-Analyse von Base 250 bis Base 615 des *FPR1*-Gens konnten die SNPs c.301G>C, c.306T>C, c.348C>T, c.488G>A, c.524C>T, c.546C>A, c.568A>T und 576T>C>G identifiziert werden. Alle SNPs befanden sich im HWE. Dies ist die erste Studie, in welcher der SNP c.524C>T beschrieben worden ist. Eine Assoziation mit einer der beiden Gruppen bestand bei diesem SNP nicht.

Da weder für die synonymen noch für die nicht-synonymen SNPs eine Assoziation mit der AP bei deutschen Patienten festgestellt wurde, konnte die Nullhypothese, dass sich das Vorkommen von Mutationen im humanen *FPR1*-Gen bei Patienten mit AP nicht von dem bei parodontal gesunden Probanden unterscheidet, nicht widerlegt werden. In deutschen Populationen stellen die bekannten SNPs des *FPR1*-Gens somit kein erhöhtes Risiko für die Anfälligkeit für AP dar.

7 Summary

There are indications that PMNs play a role in the etiology of AP (CIANCIOLA *et al.*, 1977; PAGE *et al.*, 1985; VAN DYKE *et al.*, 1980, 1982; BUCHMANN *et al.*, 2009). Genetic analyses of the *FPR1*, a chemokine receptor on PMN, in Afro-American, Brazilian, Japanese, Turkish and Caucasian populations demonstrated mutations of the receptor which were associated with the AP (GWINN *et al.*, 1999; MANEY *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2003; GUNJI *et al.*, 2007).

This is the first study, that examined, whether there are mutations at positions 301, 306, 329, 348, 378, 546, 568 or 576 of the *FPR1* gene in German patients with AP and periodontally healthy controls and if associations of these mutations with one of the two groups exist. 54 patients with AP and 54 periodontally healthy controls were recruited. At a comparable age and sex distribution and number of teeth in both groups was shown. The clinical parameters PPD, CAL, BOP, PLI and PBI were significantly different.

Blood was taken from patients and healthy volunteers, and DNA was isolated. A 584bp DNA fragment of the *FPR1* gene was amplified through PCR and subsequently sequenced externally. The DNA sequence analysis from base 250 to base 615 *FPR1* gene revealed the SNPs c.301G> C, c.306T> C, c.348C> T, c.488G> A, c.524C> T, c.546C> A, c.568A> T and 576T> C> G. All SNPs were in HWE. This is the first study in which the SNP c.524C> T was described. This SNP was not associated with one of the two groups.

As neither the synonymous nor the non-synonymous SNPs showed an association with AP in German patients, the null hypothesis, that the presence of mutations in the human *FPR1* gene in patients with AP does not differ from that in periodontally healthy subjects, could not be rejected. In conclusion the known SNPs of the *FPR1* gene do not represent an increased risk of susceptibility to AP in German populations.

Literatur

- ARMITAGE, G. C., 1995 Clinical evaluation of periodontal diseases. *Periodontology* 2000 **7**: 39–53.
- ARMITAGE, G. C., 2004 The complete periodontal examination. *Periodontology* 2000 **34**: 22–33.
- ASIKAINEN, S., 1986 Occurrence of *actinobacillus actinomycetemcomitans* and spirochetes in relation to age in localized juvenile periodontitis. *Journal of Periodontology* **57**: 537–541. PMID: 3463725.
- BECKER, E. L., 1990 The short and happy life of neutrophil activation. *Journal of Leukocyte Biology* **47**: 378–389. PMID: 2181050.
- BENDER, J. G., D. E. VAN EPPS, und D. E. CHENOWETH, 1987 Independent regulation of human neutrophil chemotactic receptors after activation. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) **139**: 3028–3033. PMID: 2822801.
- BIASI, D., L. M. BAMBARA, A. CARLETTO, P. CARAMASCHI, G. ANDRIOLI, *et al.*, 1999 Neutrophil migration, oxidative metabolism and adhesion in early onset periodontitis. *Journal Of Clinical Periodontology* **26**: 563–568.
- BLANK, J. L., K. A. BRATTAIN, und J. H. EXTON, 1992 Activation of cytosolic phosphoinositide phospholipase c by g-protein beta gamma subunits. *The Journal of Biological Chemistry* **267**: 23069–23075. PMID: 1331076.
- BOKOCH, G., 1995 Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood* **86**: 1649–1660.
- BORRELL, L., und P. PAPAPANOU, 2005 Analytical epidemiology of periodontitis. *J.Clin.Periodontol.* **32 Suppl 6**: 132–158.
- BOULAY, F., M. TARDIF, L. BROUCHON, und P. VIGNAIS, 1990a The human n-formylpeptide receptor. characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of g-protein-coupled receptors. *Biochemistry* **29**: 11123–11133.
- BOULAY, F., M. TARDIF, L. BROUCHON, und P. VIGNAIS, 1990b Synthesis and use of a novel n-formyl peptide derivative to isolate a human n-formyl peptide receptor cDNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **168**: 1103–1109. PMID: 2161213.
- BUCHMANN, R., R. ROESSLER, und A. SCULEAN, 2009 Activation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) in aggressive periodontal disease. *Quintessence International* (Berlin, Germany: 1985) **40**: 857–863. PMID: 19898718.
- BURT, B., 2005 Position paper: epidemiology of periodontal diseases. *J.Periodontol.* **76**: 1406–1419.

- CAMPS, M., C. HOU, D. SIDIROPOULOS, J. STOCK, K. JAKOBS, *et al.*, 1992 Stimulation of phospholipase c by guanine-nucleotide-binding protein beta gamma subunits. *Eur.J.Biochem.* **206**: 821–831.
- CIANCIOLA, L. J., R. J. GENCO, M. R. PATTERS, J. MCKENNA, und C. J. V. OSS, 1977 Defective polymorphonuclear leukocyte function in a human periodontal disease. *Nature* **265**: 445–447.
- CLARK, R., R. PAGE, und G. WILDE, 1977 Defective neutrophil chemotaxis in juvenile periodontitis. *Infect.Immun.* **18**: 694–700.
- COSTERTON, J., R. IRVIN, und K. CHENG, 1981 The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu.Rev.Microbiol.* **35**: 299–324.
- DAMERAU, B., E. GRÜNEFELD, und W. VOGT, 1978 Chemotactic effects of the complement-derived peptides c3a, c3ai and c5a (classical anaphylatoxin) on rabbit and guinea-pig polymorphonuclear leukocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **305**: 181–184. PMID: 732894.
- DANIEL, M., G. McDONALD, S. OFFENBACHER, und T. VAN DYKE, 1993 Defective chemotaxis and calcium response in localized juvenile periodontitis neutrophils. *J.Periodontol.* **64**: 617–621.
- DARVEAU, R., A. TANNER, und R. PAGE, 1997 The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol.2000.* **14**: 12–32.
- DEL, F. M., L. FRANCETTI, L. PIZZONI, R. ROZZA, und R. WEINSTEIN, 2000 [Neutrophil physiology: role and mechanism of action in the immune response at gingival level]. *Minerva Stomatol.* **49**: 227–248.
- DELIMA, A. J., und T. E. VAN DYKE, 2003 Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontology 2000* **31**: 55–76.
- DEMMER, R. T., und P. N. PAPAPANOU, 2010 Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000* **53**: 28–44. PMID: 20403103.
- DENARDIN, E., C. DELUCA, M. LEVINE, und R. GENCO, 1990 Antibodies directed to the chemotactic factor receptor detect differences between chemotactically normal and defective neutrophils from LJP patients. *J.Periodontol.* **61**: 609–617.
- DENNISON, D., und T. VAN DYKE, 1997 The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol.2000* **14**: 54–78.
- DIAS, I. H. K., J. B. MATTHEWS, I. L. C. CHAPPLE, H. J. WRIGHT, C. R. DUNSTON, *et al.*, 2011 Activation of the neutrophil respiratory burst by plasma from periodontitis patients is mediated by pro-inflammatory cytokines. *Journal of Clinical Periodontology* **38**: 1–7. PMID: 20964702.

- DIXON, D. R., B. W. BAINBRIDGE, und R. P. DARVEAU, 2004 Modulation of the innate immune response within the periodontium. *Periodontology* 2000 **35**: 53–74.
- ECKERT, K. A., und T. A. KUNKEL, 1991 DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *Genome Research* **1**: 17–24.
- EDDY, R., L. PIERINI, F. MATSUMURA, und F. MAXFIELD, 2000 Ca²⁺-dependent myosin II activation is required for uropod retraction during neutrophil migration. *J. Cell Sci.* **113** (Pt 7): 1287–1298.
- ERNST, S., C. LANGE, A. WILBERS, V. GOEBELER, V. GERKE, *et al.*, 2004 An annexin 1 n-terminal peptide activates leukocytes by triggering different members of the formyl peptide receptor family. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) **172**: 7669–7676. PMID: 15187149.
- FERNANDEZ, H. N., P. M. HENSON, A. OTANI, und T. E. HUGLI, 1978 Chemotactic response to human c3a and c5a anaphylatoxins. i. evaluation of c3a and c5a leukotaxis in vitro and under stimulated in vivo conditions. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) **120**: 109–115. PMID: 342601.
- FINE, D. H., K. MARKOWITZ, D. FURGANG, K. FAIRLIE, J. FERRANDIZ, *et al.*, 2007 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 3859–3869. PMID: 17942658.
- FU, H., L. BJORKMAN, P. JANMEY, A. KARLSSON, J. KARLSSON, *et al.*, 2004 The two neutrophil members of the formylpeptide receptor family activate the NADPH-oxidase through signals that differ in sensitivity to a gelsolin derived phosphoinositide-binding peptide. *BMC Cell Biol.* **5**.
- FU, H., J. KARLSSON, J. BYLUND, C. MOVITZ, A. KARLSSON, *et al.*, 2006 Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* **79**: 247–256. PMID: 16365159.
- GAVINS, F. N. E., 2010 Are formyl peptide receptors novel targets for therapeutic intervention in ischaemia-reperfusion injury? *Trends in Pharmacological Sciences* **31**: 266–276. PMID: 20483490.
- GENCO, R., T. VAN DYKE, M. LEVINE, R. NELSON, und M. WILSON, 1986 1985 kreslover lecture. molecular factors influencing neutrophil defects in periodontal disease. *J. Dent. Res.* **65**: 1379–1391.
- GENCO, R., T. VAN DYKE, B. PARK, M. CIMINELLI, und H. HOROSZEWICZ, 1980 Neutrophil chemotaxis impairment in juvenile periodontitis: evaluation of specificity, adherence, deformability, and serum factors. *J. Reticuloendothel. Soc.* **28**: 81s–91s.
- GILLITZER, R., und M. GOEBELER, 2001 Chemokines in cutaneous wound healing. *Journal of Leukocyte Biology* **69**: 513–521. PMID: 11310836.

- GOETZL, E. J., und W. C. PICKETT, 1981 Novel structural determinants of the human neutrophil chemotactic activity of leukotriene b. *The Journal of Experimental Medicine* **153**: 482–487. PMID: 6264017.
- GRAFFELMAN, J., und J. M. CAMARENA, 2008 Graphical tests for Hardy-Weinberg equilibrium based on the ternary plot. *Human Heredity* **65**: 77–84. PMID: 17898538.
- GRONERT, K., A. KANTARCI, B. LEVY, C. CLISH, S. ODPARLIK, *et al.*, 2004 A molecular defect in intracellular lipid signaling in human neutrophils in localized aggressive periodontal tissue damage. *J.Immunol.* **172**: 1856–1861.
- GUARNIERI, C., G. ZUCHELLI, F. BERNARDI, M. SCHEDA, und R. FREZZA, 1989 [Polymorphonuclear neutrophilic granulocytes and the defense and damage of periodontal tissues]. *Minerva Stomatol.* **38**: 783–794.
- GUNJI, T., Y. ONOUCHI, T. NAGASAWA, S. KATAGIRI, H. WATANABE, *et al.*, 2007 Functional polymorphisms of the FPR1 gene and aggressive periodontitis in japanese. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **364**: 7–13. PMID: 17927965.
- GWINN, M., A. SHARMA, und N. E. DE, 1999 Single nucleotide polymorphisms of the n-formyl peptide receptor in localized juvenile periodontitis. *J.Periodontol.* **70**: 1194–1201.
- HEIT, B., S. TAVENER, E. RAHARJO, und P. KUBES, 2002 An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *The Journal of Cell Biology* **159**: 91–102. PMID: 12370241.
- HEITZ-MAYFIELD, L., 2005 Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **32**: 196–209.
- HEROLD, C., und T. BECKER, 2009 Genetic association analysis with FAMHAP: a major program update. *Bioinformatics (Oxford, England)* **25**: 134–136. PMID: 19015131.
- HOLTFRETER, B., C. SCHWAHN, R. BIFFAR, und T. KOCHER, 2009 Epidemiology of periodontal diseases in the study of health in pomerania. *Journal of Clinical Periodontology* **36**: 114–123. PMID: 19207886.
- JALINK, K., und W. H. MOOLENAAR, 2010 G protein-coupled receptors: the inside story. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* **32**: 13–16. PMID: 20020476.
- JANSSON, L., S. LAVSTEDT, und M. ZIMMERMAN, 2002 Prediction of marginal bone loss and tooth loss—a prospective study over 20 years. *Journal of Clinical Periodontology* **29**: 672–678. PMID: 12390562.
- JONES, B., H. MIETTINEN, A. JESAITIS, und J. MILLS, 2003 Mutations of f110 and c126 of the formyl peptide receptor interfere with g-protein coupling and chemotaxis. *J.Periodontol.* **74**: 475–484.

- KANTARCI, A., H. HASTURK, und T. E. DYKE, 2006 Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. *Periodontology 2000* **40**: 144–163.
- KANTARCI, A., K. OYAZU, und T. VAN DYKE, 2003 Neutrophil-mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: findings from localized aggressive periodontitis. *J.Periodontol.* **74**: 66–75.
- KANTARCI, A., und T. VAN DYKE, 2005a Lipoxin signaling in neutrophils and their role in periodontal disease. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids.* **73**: 289–299.
- KANTARCI, A., und T. VAN DYKE, 2005b Resolution of inflammation in periodontitis. *J.Periodontol.* **76**: 2168–2174.
- KELLER, H. U., und E. SORKIN, 1965 Studies on chemotaxis. i. on the chemotactic and complement-fixing activity of gamma-globulins. *Immunology* **9**: 241–247. PMID: 4158288.
- KINANE, D., 2001 Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol.2000.* **25**: 8–20.
- KINANE, D., und R. ATTSTROM, 2005 Advances in the pathogenesis of periodontitis. group b consensus report of the fifth european workshop in periodontology. *J.Clin.Periodontol.* **32 Suppl 6**: 130–131.
- KINANE, D., C. CULLEN, F. JOHNSTON, und C. EVANS, 1989 Neutrophil chemotactic behaviour in patients with early-onset forms of periodontitis (I). leading front analysis in boyden chambers. *J.Clin.Periodontol.* **16**: 242–246.
- KOLENBRANDER, P., 2000 Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu.Rev.Microbiol.* **54**: 413–437.
- KORNMAN, K., R. PAGE, und M. TONETTI, 1997 The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol.2000* **14**: 33–53.
- LANG, N., 1999 1999 international international workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. papers. oak brook, illinois, october 30–November 2, 1999. *Ann.Periodontol.* **4**: i, 1–i112.
- LANGE, D. E., 1981 *Parodontologie in der täglichen Praxis.*. Berlin, Quintessenz,.
- LAUFFENBURGER, D., R. ARIS, und K. KELLER, 1982 Effects of cell motility and chemotaxis on microbial population growth. *Biophysical Journal* **40**: 209–219. PMID: 7183335.
- LAVSTEDT, S., A. BOLIN, und C. O. HENRIKSON, 1986 Proximal alveolar bone loss in a longitudinal radiographic investigation. II. a 10-year follow-up study of an epidemiologic material. *Acta Odontologica Scandinavica* **44**: 199–205. PMID: 3465191.
- LE, Y., Y. YANG, Y. CUI, H. YAZAWA, W. GONG, *et al.*, 2002 Receptors for chemotactic formyl peptides as pharmacological targets. *International Immunopharmacology* **2**: 1–13. PMID: 11789660.

- LEHRER, R. I., 1971 The role of phagocyte function in resistance to infection. *California Medicine* **114**: 17–25. PMID: 4931050.
- LISTGARTEN, M., 1986 Pathogenesis of periodontitis. *J.Clin.Periodontol.* **13**: 418–430.
- LIU, R., C. CAO, H. MENG, and Y. GAO, 2001 Polymorphonuclear neutrophils and their mediators in gingival tissues from generalized aggressive periodontitis. *J.Periodontol.* **72**: 1545–1553.
- LOPEZ, N., J. MELLADO, M. GIGLIO, and G. LEIGHTON, 1995 Occurrence of certain bacterial species and morphotypes in juvenile periodontitis in chile. *J.Periodontol.* **66**: 559–567.
- MADIANOS, P., Y. BOBETIS, and D. KINANE, 2005 Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J.Clin.Periodontol.* **32 Suppl 6**: 57–71.
- MALECH, H. L., R. K. ROOT, and J. I. GALLIN, 1977 Structural analysis of human neutrophil migration. centriole, microtubule, and microfilament orientation and function during chemotaxis. *The Journal of Cell Biology* **75**: 666–693. PMID: 562885.
- MANEY, P., P. EMECEN, J. S. MILLS, and J. D. WALTERS, 2009 Neutrophil formylpeptide receptor single nucleotide polymorphism 348T>C in aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology* **80**: 492–498. PMID: 19254133.
- MANEY, P., and J. D. WALTERS, 2009 Formylpeptide receptor single nucleotide polymorphism 348T>C and its relationship to polymorphonuclear leukocyte chemotaxis in aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology* **80**: 1498–1505. PMID: 19722801.
- MARKKANEN, H., M. RAJALA, M. KNUUTILA, and S. LAMMI, 1981 Alveolar bone loss in relation to periodontal treatment need, socioeconomic status and dental health. *Journal of Periodontology* **52**: 99–103. PMID: 6939830.
- MARSH, P., 2004 Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* **38**: 204–211.
- MASADA, M., R. PERSSON, J. KENNEY, S. LEE, R. PAGE, *et al.*, 1990 Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J.Periodontal Res.* **25**: 156–163.
- MELVIN, W. L., J. B. SANDIFER, and J. L. GRAY, 1991 The prevalence and sex ratio of juvenile periodontitis in a young racially mixed population. *Journal of Periodontology* **62**: 330–334. PMID: 2072246.
- MEYLE, J., 1996 *Granulozytenfunktion und psychische Einflüsse bei profunder marginaler Parodontitis*. Hanser Fachbuchverlag.
- MIETTINEN, H. M., J. S. MILLS, J. M. GRIPENTROG, E. A. DRATZ, B. L. GRANGER, *et al.*, 1997 The ligand binding site of the formyl peptide receptor maps in the transmembrane region. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **159**: 4045–4054. PMID: 9378994.

- MIGEOTTE, I., D. COMMUNI, und M. PARMENTIER, 2006 Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of g protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **17**: 501–519. PMID: 17084101.
- MINELLI, C., J. R. THOMPSON, K. R. ABRAMS, A. THAKKINSTIAN, und J. ATTIA, 2008 How should we use information about HWE in the meta-analyses of genetic association studies? *International Journal of Epidemiology* **37**: 136 –146.
- MURPHY, P. M., H. TIFFANY, D. McDERMOTT, und S. K. AHUJA, 1993 Sequence and organization of the human n-formyl peptide receptor-encoding gene. *Gene* **133**: 285–290.
- NISHIDA, M., S. GROSSI, R. DUNFORD, A. HO, M. TREVISAN, *et al.*, 2000 Calcium and the risk for periodontal disease. *J.Periodontol.* **71**: 1057–1066.
- NISHIHARA, T., und T. KOSEKI, 2004 Microbial etiology of periodontitis. *Periodontol.2000.* **36**: 14–26.
- OFFENBACHER, S., und J. ZAMBON, 1996 Consensus report. periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann.Periodontol.* **1**: 926–932.
- O'LEARY, T. J., R. B. DRAKE, und J. E. NAYLOR, 1972 The plaque control record. *Journal of Periodontology* **43**: 38. PMID: 4500182.
- PAGE, R., und H. SCHROEDER, 1981 Current status of the host response in chronic marginal periodontitis. *J.Periodontol.* **52**: 477–491.
- PAGE, R., T. SIMS, F. GEISSLER, L. ALTMAN, und D. BAAB, 1985 Defective neutrophil and monocyte motility in patients with early onset periodontitis. *Infect.Immun.* **47**: 169–175.
- PAPAPANOU, P. N., J. L. WENNSTROM, und K. GRONDAHL, 1988 Periodontal status in relation to age and tooth type. a cross-sectional radiographic study. *Journal of Clinical Periodontology* **15**: 469–478.
- PARK, D., D. JHON, C. LEE, K. LEE, und S. RHEE, 1993 Activation of phospholipase c isozymes by g protein beta gamma subunits. *J.Biol.Chem.* **268**: 4573–4576.
- PEREZ, H., E. KELLY, F. ELFMAN, G. ARMITAGE, und J. WINKLER, 1991 Defective polymorphonuclear leukocyte formyl peptide receptor(s) in juvenile periodontitis. *J.Clin.Invest* **87**: 971–976.
- PEREZ, H. D., L. VILANDER, W. H. ANDREWS, und R. HOLMES, 1994 Human formyl peptide receptor ligand binding domain(s). studies using an improved mutagenesis/expression vector reveal a novel mechanism for the regulation of receptor occupancy. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 22485–22487. PMID: 8077194.
- PRESHAW, P., R. SEYMOUR, und P. HEASMAN, 2004 Current concepts in periodontal pathogenesis. *Dent.Update.* **31**: 570–578.

- PROSSNITZ, E. R., und R. D. YE, 1997 The n-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function. *Pharmacology & Therapeutics* **74**: 73–102. PMID: 9336017.
- RADEL, S., R. GENCO, und N. E. DE, 1994 Structural and functional characterization of the human formyl peptide receptor ligand-binding region. *Infect.Immun.* **62**: 1726–1732.
- ROHNER, F., G. CIMASONI, und P. VUAGNAT, 1983 Longitudinal radiographical study on the rate of alveolar bone loss in patients of a dental school. *Journal of Clinical Periodontology* **10**: 643–651. PMID: 6581178.
- SALONEN, L. W. E., L. FRITHIOF, F. R. WOUTERS, und L. B. HELLDEN, 1991 Marginal alveolar bone height in an adult swedish population. a radiographic cross-sectional epidemiologic study. *Journal of Clinical Periodontology* **18**: 223–232.
- SAMANTA, A. K., J. J. OPPENHEIM, und K. MATSUSHIMA, 1990 Interleukin 8 (monocyte-derived neutrophil chemotactic factor) dynamically regulates its own receptor expression on human neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry* **265**: 183–189. PMID: 2403554.
- SAVAGE, A., K. A. EATON, D. R. MOLES, und I. NEEDLEMAN, 2009 A systematic review of definitions of periodontitis and methods that have been used to identify this disease. *Journal of Clinical Periodontology* **36**: 458–467.
- SCHENKEIN, H. A., 1999 The pathogenesis of periodontal diseases. *J.Periodontol.* **70**: 457–470.
- SCHENKEIN, H. A., 2006 Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontology 2000* **40**: 77–93.
- SCHIFFMANN, E., B. A. CORCORAN, und S. M. WAHL, 1975a N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**: 1059–1062. PMID: 1093163.
- SCHIFFMANN, E., H. V. SHOWELL, B. A. CORCORAN, P. A. WARD, E. SMITH, *et al.*, 1975b The isolation and partial characterization of neutrophil chemotactic factors from *escherichia coli*. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **114**: 1831–1837. PMID: 165239.
- SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W., Y. Y. SHIH, und S. CHIEN, 1980 Morphometry of human leukocytes. *Blood* **56**: 866–875. PMID: 6775712.
- SCHNEIDER, I. C., und J. M. HAUGH, 2006 Mechanisms of gradient sensing and chemotaxis: conserved pathways, diverse regulation. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* **5**: 1130–1134. PMID: 16760661.
- SCHRÖDER, J. M., 2000 Chemoattractants as mediators of neutrophilic tissue recruitment. *Clinics in Dermatology* **18**: 245–263. PMID: 10856658.

- SEIFERT, R., und K. WENZEL-SEIFERT, 2001 Defective gi protein coupling in two formyl peptide receptor mutants associated with localized juvenile periodontitis. *J.Biol.Chem.* **276**: 42043–42049.
- SERVATICI, R., S. FALZARANO, A. MOLLIKA, und S. SPISANI, 2006 Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *European Journal of Pharmacology* **534**: 1–11. PMID: 16516193.
- SEO, S. W., J. YANG, und G. Y. JUNG, 2009 Quantitative correlation between mRNA secondary structure around the region downstream of the initiation codon and translational efficiency in escherichia coli. *Biotechnology and Bioengineering* **104**: 611–616. PMID: 19579224.
- SERVANT, G., O. D. WEINER, E. R. NEPTUNE, J. W. SEDAT, und H. R. BOURNE, 1999 Dynamics of a chemoattractant receptor in living neutrophils during chemotaxis. *Molecular Biology of the Cell* **10**: 1163–1178. PMID: 10198064.
- SHAPIRA, L., A. WILENSKY, und D. KINANE, 2005 Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. *J.Clin.Periodontol.* **32 Suppl 6**: 72–86.
- SHAPIRO, J., 1998 Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu.Rev.Microbiol.* **52**: 81–104.
- SHIBATA, K., M. L. WARBINGTON, B. J. GORDON, H. KURIHARA, und T. E. VAN DYKE, 2001 Nitric oxide synthase activity in neutrophils from patients with localized aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology* **72**: 1052–1058. PMID: 11525437.
- SIGUSCH, B., S. EICK, W. PFISTER, G. KLINGER, und E. GLOCKMANN, 2001 Altered chemotactic behavior of crevicular PMNs in different forms of periodontitis. *J.Clin.Periodontol.* **28**: 162–167.
- SMITH, J., 1994 Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J.Leukoc.Biol.* **56**: 672–686.
- SMITH, M., G. J. SEYMOUR, und M. P. CULLINAN, 2010 Histopathological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000* **53**: 45–54.
- SOCRANSKY, S., und A. HAFFAJEE, 2005 Periodontal microbial ecology. *Periodontol.2000.* **38**: 135–187.
- STUART, J., 1993 ICSH recommendations for measurement of erythrocyte sedimentation rate. international council for standardization in haematology (Expert panel on blood rheology). *J.Clin.Pathol.* **46**: 198–203.
- TEW, J., D. MARSHALL, J. BURMEISTER, und R. RANNEY, 1985 Relationship between gingival crevicular fluid and serum antibody titers in young adults with generalized and localized periodontitis. *Infect.Immun.* **49**: 487–493.

- TUFANO, M., R. IANNIELLO, M. SANGES, und F. ROSSANO, 1992 Neutrophil function in rapidly progressive and adult periodontitis. *Eur.J.Epidemiol.* **8**: 67–73.
- VAN DYKE, T., und G. HOOP, 1990 Neutrophil function and oral disease. *Crit Rev.Oral Biol.Med.* **1**: 117–133.
- VAN DYKE, T., H. HOROSZEWICZ, L. CIANCIOLA, und R. GENCO, 1980 Neutrophil chemotaxis dysfunction in human periodontitis. *Infect.Immun.* **27**: 124–132.
- VAN DYKE, T., und C. SERHAN, 2003 Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J.Dent.Res.* **82**: 82–90.
- VAN DYKE, T. E., H. U. HOROSZEWICZ, und R. J. GENCO, 1982 The polymorphonuclear leukocyte (PMNL) locomotor defect in juvenile periodontitis. study of random migration, chemokinesis and chemotaxis. *Journal of Periodontology* **53**: 682–687. PMID: 6960166.
- VAN DYKE, T. E., M. SCHWEINEBRATEN, L. J. CIANCIOLA, S. OFFENBACHER, und R. J. GENCO, 1985 Neutrophil chemotaxis in families with localized juvenile periodontitis. *Journal of Periodontal Research* **20**: 503–514. PMID: 2934535.
- VAN HAASTERT, P. J. M., und P. N. DEVREOTES, 2004 Chemotaxis: signalling the way forward. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **5**: 626–634. PMID: 15366706.
- VAN WINKELHOFF, A., J. RODENBURG, R. GOENE, F. ABBAS, E. WINKEL, *et al.*, 1989 Metronidazole plus amoxycillin in the treatment of actinobacillus actinomycetemcomitans associated periodontitis. *J.Clin.Periodontol.* **16**: 128–131.
- VENSELAAR, H., T. A. H. TE BEEK, R. K. P. KUIPERS, M. L. HEKKELMAN, und G. VRIEND, 2010 Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. an e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics* **11**: 548. PMID: 21059217.
- WARD, P. A., C. G. COCHRANE, und H. J. MUELLER-EBERHARD, 1965 THE ROLE OF SERUM COMPLEMENT IN CHEMOTAXIS OF LEUKOCYTES IN VITRO. *The Journal of Experimental Medicine* **122**: 327–346. PMID: 14316948.
- WENZEL-SEIFERT, K., J. M. ARTHUR, H. LIU, und R. SEIFERT, 1999 Quantitative analysis of formyl peptide receptor coupling to gi?1, gi?2, and gi?3. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 33259–33266.
- WILKINSON, P. C., 1998 Assays of leukocyte locomotion and chemotaxis. *Journal of Immunological Methods* **216**: 139–153. PMID: 9760220.
- WITKO-SARSAT, V., P. RIEU, B. SCAMPS LATSCHA, P. LESAVRE, und L. HALBWACHS-MECARELLI, 2000 Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* **80**: 617–653.
- WITKE-THOMPSON, J. K., A. PLUZHNIKOV, und N. J. COX, 2005 Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium. *American Journal of Human Genetics* **76**: 967–986. PMID: 15834813.

- WOOD, S., J. KIRKHAM, P. MARSH, R. SHORE, B. NATTRESS, *et al.*, 2000 Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J.Dent.Res.* **79**: 21–27.
- YANG, K. H., H. FANG, J. S. YE, J. Z. GONG, J. T. WANG, *et al.*, 2008 The main functions and structural modifications of tripeptide n-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) as a chemotactic factor. *Die Pharmazie* **63**: 779–783. PMID: 19069235.
- YE, R. D., F. BOULAY, J. M. WANG, C. DAHLGREN, C. GERARD, *et al.*, 2009 International union of basic and clinical pharmacology. LXXIII. nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacological Reviews* **61**: 119–161. PMID: 19498085.
- ZHANG, Y., R. SYED, C. UYGAR, D. PALLOS, M. GORRY, *et al.*, 2003 Evaluation of human leukocyte n-formylpeptide receptor (FPR1) SNPs in aggressive periodontitis patients. *Genes Immun.* **4**: 22–29.
- ZIEGLER, A., K. VAN STEEN, und S. WELLEK, 2010 Investigating Hardy–Weinberg equilibrium in case–control or cohort studies or meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment* **128**: 197–201.
- ZIGMOND, S. H., 1977 Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *The Journal of Cell Biology* **75**: 606–616. PMID: 264125.
- ZIGMOND, S. H., 1978 Chemotaxis by polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of Cell Biology* **77**: 269–287. PMID: 649652.

8 Anhang

8.1 Einverständniserklärung

Untersuchungen an einem bestimmten Abschnitt des Erbguts und an Abwehrzellen bei Patienten mit aggressiver Parodontitis

Aufklärungsbogen und Einwilligungserklärung

Vollständige Bezeichnung des Forschungsvorhabens: Genetische und funktionelle Analysen des Formyl-Peptid-Rezeptors bei Patienten mit aggressiver Parodontitis

Verantwortlicher Träger und Leiter des Forschungsvorhabens: Prof. Dr. Jörg Meyle

Proband/in (Name, Vorname):

....., geb. am Teiln.-Nr.

Sehr geehrte Probandin, sehr geehrter Proband,

unsere Arbeitsgruppe ist sehr daran interessiert, neue wissenschaftliche Erkenntnisse in dem oben genannten Forschungsvorhaben zu gewinnen. Wir wären Ihnen daher sehr dankbar, wenn Sie sich zu einer Teilnahme bereit erklären würden. Diese ist selbstverständlich freiwillig. Sie werden in dieses Forschungsvorhaben also nur dann einbezogen, wenn Sie Ihre Einwilligung erklären. Um Sie über das Vorhaben und über die etwaigen Vorteile und Risiken Ihrer Teilnahme zu informieren, wird der verantwortliche Arzt ein ausführliches Gespräch mit Ihnen führen. Vor diesem Gespräch **möchten wir Sie bitten, die nachfolgenden Ausführungen zu lesen**. Sie können sich dadurch bereits einen eingehenden Überblick verschaffen.

A. Das Forschungsvorhaben

1. Worum geht es?

Parodontitis ist eine entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates. Im Laufe des Entzündungsprozesses wird der Zahnhalteapparat nach und nach zerstört. Wird der Entzündungsprozess nicht aufgehalten, kann die Zerstörung des Zahnhalteapparates bis zum Verlust des Zahnes fortschreiten.

Die aggressive Parodontitis ist eine besondere Form einer entzündlichen Erkrankung des Zahnhalteapparates. Bei Patienten mit aggressiver Parodontitis wird der Zahnhalteapparat besonders schnell zerstört. Oft beginnt diese Erkrankungsform schon im jugendlichen Alter. Leider ist über die Ursache der aggressiven Parodontitis wenig bekannt. Eine Vermutung ist jedoch, dass Patienten mit aggressiver Parodontitis besondere Risikofaktoren für die Erkrankung in ihrem Erbgut besitzen. Diese Risikofaktoren können wohlmöglich zu einer Veränderung des Verhaltens von Abwehrzellen gegen Bakterien führen.

Im Rahmen des Vorhabens ist geplant, bei Ihnen den gesundheitlichen Zustand des Zahnhalteapparates zu untersuchen und eine Blutprobe aus Ihrer Armvene zu entnehmen. Das Blut wird anschließend untersucht, um Aufschluss über Entzündungsprozesse in Ihrem Körper zu erhalten. Außerdem kann mit Hilfe Ihres Blutes ein bestimmter Abschnitt Ihres Erbguts untersucht werden, der für die Funktion einiger Abwehrzellen von Bedeutung ist. Die Art und die Reihenfolge der einzelnen Bausteine dieses Erbgutabschnitts werden entschlüsselt. Ihr



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6636-9



9 783835 196636 9

Photo cover: © dermatzke @ fotolia.de